



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

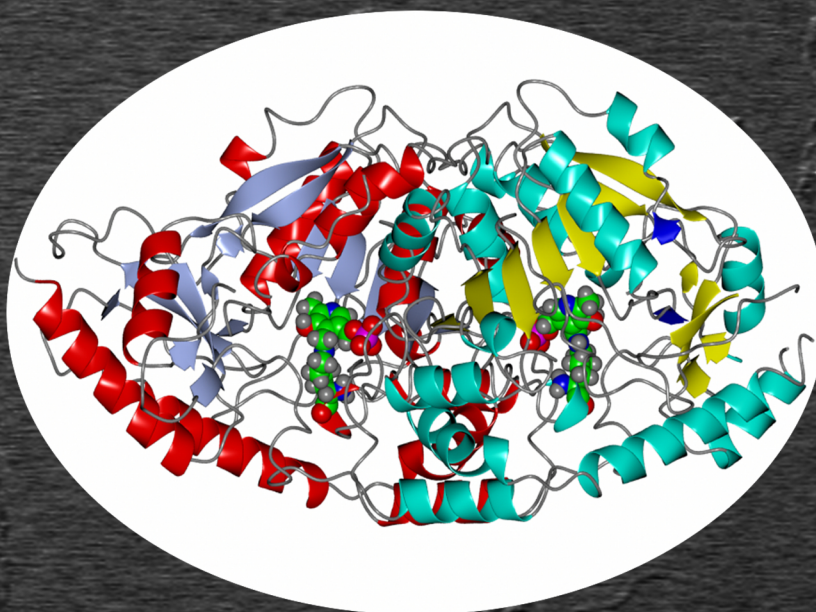
FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS

**Caracterización estructural y funcional
de la tirosina aminotransferasa
de *Leishmania infantum***



Miguel Ángel Moreno Izquierdo

TESIS DOCTORAL

Madrid, 2016



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS
CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS

Caracterización estructural y funcional de la tirosina aminotransferasa de *Leishmania infantum*.

Miguel Ángel Moreno Izquierdo

TESIS DOCTORAL

Madrid, 2016



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS
CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS

Caracterización estructural y funcional de la tirosina aminotransferasa de *Leishmania infantum*.

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Miguel Ángel Moreno Izquierdo

Bajo la dirección de los Doctores:

Ana María Alonso Ayala

Pedro José Alcolea Alcolea

Madrid, 2016

**Memoria presentada por Miguel Ángel Moreno Izquierdo para optar al
Grado de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid en el marco del
Programa de Doctorado en Bioquímica, Biología Molecular, Biomedicina y
Biotecnología (Biociencias Moleculares).**

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en el Centro de Investigaciones Biológicas (Consejo Superior de Investigaciones Científicas, CSIC, Madrid) bajo la dirección de los Doctores D^a Ana María Alonso Ayala y D. Pedro José Alcolea Alcolea, contando con una beca del Programa JAE Predoctoral del CSIC.



D^a Ana María Alonso Ayala y D. Pedro José Alcolea Alcolea, doctores por la Universidad Complutense de Madrid,

Certifican:

Que la Tesis Doctoral titulada "Caracterización estructural y funcional de la tirosina aminotransferasa de *Leishmania infantum*" presentada por D. Miguel Ángel Moreno Izquierdo, Licenciado en Farmacia por la Universidad Complutense de Madrid, ha sido realizada bajo su dirección en el laboratorio de Parasitología Molecular del Centro de Investigaciones Biológicas (Consejo Superior de Investigaciones Científicas) y cumple los requisitos exigidos por la legislación vigente para optar al grado de Doctor.

De acuerdo a lo expuesto, firman este certificado, autorizando su presentación y defensa, a cuatro de abril de 2016.

A mis padres, gracias por estar ahí siempre

A Eva, gracias por compartir tu vida conmigo

Agradecimientos

Espero poder exponer mis agradecimientos sin caer en el sentimentalismo, lo cual es bastante difícil dado el número de personas extraordinarias que me han rodeado en estos años.

En primer lugar a mis directores de tesis. A la Dra. Ana Alonso, por todo que me ha enseñado porque para mí ha sido un orgullo poder compartir estos años con ella. Al Dr. Pedro Alcolea, una grandísima persona que me ha guiado desde que entré en el laboratorio con aquella beca de verano y del que espero poder seguir aprendiendo muchos más años. Además también agradezco al Profesor Vicente Larraga por haberme dado la oportunidad de desarrollar este trabajo en su laboratorio de Parasitología Molecular y por haberme transmitido sus conocimientos y su apoyo aún en los momentos difíciles.

Al Profesor Peter Myler del Seattle Biomedical Research Institute, por su cercanía y por permitirme trabajar en su equipo durante tres meses, y por todo lo que aprendí durante el tiempo que estuve allí.

Al Profesor Antonio Jiménez de la Universidad de Alcalá de Henares, con el que desarrollé los mutantes de sobreexpresión de esta tesis y que me acogió en su laboratorio como uno más. Muchas gracias por los consejos y las enseñanzas que han permitido el avance de esta tesis.

Al Profesor Basilio Valladares, catedrático de la Universidad de la Laguna, por acogerme durante una semana en su laboratorio y permitirme trabajar con su equipo.

Al Profesor Dan Zilberstein, del Instituto Tecnológico de Israel, por permitirme haberle enseñado el trabajo expuesto en esta tesis y por las valiosas ideas que nos ha dado.

A los Doctores Rafael Giraldo, Ramón Díaz y Fernando Díaz del Centro de Investigaciones Biológicas que en determinados momentos me han ayudado y aconsejado con determinados experimentos.

A los Doctores Alfredo Toraño, Mercedes Domínguez e Inmaculada Moreno del Centro Nacional de Microbiología por la ayuda y el material prestado.

Al Dr. Mario García Lacoba del Centro de Investigaciones Biológicas por la ayuda en toda la parte de bioinformática desarrollada en el presente trabajo y por escucharme con todas mis dudas.

A las Dra. Alicia Prieto y M^a Jesús Martínez, que me ayudaron con el primer experimento que realicé y me facilitaron los aparatos necesarios para la consecución de los mismos.

Al Dr. Francisco García que me ayudó y del que aprendí a trabajar con técnicas de proteómica

A toda la gente que está, ha estado o está en nuestro laboratorio. A María, Jaime y Luis que están desarrollando sus tesis actualmente, a Silvia (la persona con la que más tiempo he pasado en el laboratorio y con la que he compartido cotilleos y confidencias), a Abel con el que empecé a trabajar y que espero que le vaya bien, a Diana que tiene una niña monísima y a Anita que me ha aguantado de un modo encomiable.

A mis pequeños amigos colombianos Natalia y Néstor. A Luis y Chelo (y a la pequeña Inés). A Mariángeles por darme ánimos cuando me encontraba estresado por el pasillo, y a toda la gente que está o ha estado en su laboratorio: Luque (gracias por tu experiencia viajera), María Fernández, Daniela y Almudena. A las dos Pilares (Zaragoza y Fernández) que además de nombre compartís el ser tan buenas personas las dos.

A todas las personas del CIB, por los buenos momentos. A Laura porque aquel premio de baile es más tuyo que de cualquiera de nosotros, a Miguel Estepa y Damián (y a sus allegados) por confiar de algún modo en que cada vez que salían conmigo iban a volver a casa sanos. A Srdja (espero que te vaya bien todo en Dinamarca y a ver si aprendes a hablar danés mejor que español). Y a todos con los que me cruzo por el pasillo y con los que me echo unas buenas risas: Gonzalo, Albert, Mariano, Hugo, Zaida y toda la gente de los Rubenes y Javi.

A todas las personas con las que he podido trabajar durante mis estancias en Seattle (Ariel, Aarthi, Sally, Dmitry, Sunny) en la Universidad de Alcalá de Henares (Carlos, Cristina, Miguel) y en la Universidad de la Laguna (Gemma, Ana, Yasmina y Edu).

A mis compañeros de universidad por estar siempre ahí: Ana y Alberto, Sandrita y David, Marta y Roberto y compañía, Rocío y Juancarlos, JC, Blanquita. Y como no a mi compañero de aventuras asiáticas, Eugenio.

A toda mi familia (Tíos, Suegros, Primos, Cuñados y Sobrinita)

A mi abuela por el cariño que me ha dado en estos años y por ser un apoyo incondicional. Y a mi abuelo que siento que no haya podido estar en este año tan importante, pero que me ha dejado tanto y me ha enseñado tanto desde que tengo recuerdos que parece que no se hubiera ido.

A mis padres que tanto apoyo y cariño de todo tipo me han dado y a mi hermana a la que he visto crecer y de la que me siento tan orgulloso.

Por último, es imposible explicar en unas breves líneas todo lo que le debo a la persona con la que comparto mi vida. Gracias por las mañanas, tardes y noches que me has acompañado de lunes a domingo en el trabajo. Gracias por aguantar mis ratos de mal humor. Gracias por apoyarme en estos últimos meses, porque sin ti nada de esto sería posible. Gracias por tu apoyo y tu compañía.

Índice

<u>Summary</u>	VII
<u>Resumen</u>	IX
<u>Abreviaturas</u>	XI
1. <u>Introducción.</u>	1
1.1. <u>Leishmaniasis.</u>	3
1.1.1. Epidemiología.	3
1.1.2. Manifestaciones clínicas.	5
1.1.2.1. Leishmaniasis humana.	5
1.1.2.2. Leishmaniasis canina.	6
1.1.3. Diagnóstico de la leishmaniasis.	7
1.1.4. Interacción entre <i>Leishmania</i> y el hospedador: la respuesta inmunitaria.	7
1.1.5. Control de la enfermedad.	8
1.1.5.1. Control del vector y del reservorio.	8
1.1.5.2. Vacunas frente a la leishmaniasis.	8
1.1.5.3. Tratamiento.	9
1.2. <u>El género <i>Leishmania</i>.</u>	11
1.2.1. Taxonomía y filogenia.	11
1.2.2. Ciclo biológico de <i>Leishmania</i>.	12
1.2.3. Morfología y ultraestructura de <i>Leishmania</i>.	14
1.2.4. El cultivo <i>in vitro</i> de promastigotes de <i>Leishmania</i>.	15
1.2.5. Factores que influyen en la diferenciación a amastigote y cultivo <i>in vitro</i> de amastigotes axénicos.	16
1.2.6. El metabolismo en <i>Leishmania</i>.	17
1.2.6.1. El metabolismo de aminoácidos.	18
1.2.6.2. El metabolismo de aminoácidos aromáticos.	19
1.3. <u>La tirosina aminotransferasa.</u>	19
1.3.1. Clasificación de las aminotransferasas.	20
1.3.2. Mecanismo de acción de la tirosina aminotransferasa.	21
2. <u>Objetivos.</u>	25

3.	<u>Material y métodos.</u>	29
3.1.	<u>Material biológico.</u>	31
3.1.1.	Bacterias.	31
3.1.2.	Parásitos.	31
3.1.3.	Línea celular humana.	31
3.1.4.	Modelo experimental de ratón.	31
3.2.	<u>Cultivos celulares.</u>	31
3.2.1.	Cultivos bacterianos.	31
3.2.2.	Preparación y transformación de bacterias competentes.	32
3.2.3.	Cultivo de <i>Leishmania</i> spp.	32
3.2.3.1.	Cultivo de promastigotes y amastigotes axénicos.	32
3.2.3.2.	Obtención de amastigotes intracelulares e infección <i>in vitro</i> .	33
3.2.3.3.	Obtención de promastigotes con mayor infectividad a partir de cultivos axénicos.	33
3.2.3.4.	Transfección de promastigotes de <i>L. infantum</i> para la generación de líneas celulares <i>knock-in</i> .	34
3.3.	<u>Detección de <i>p</i>-hidroxifenil lactato en el sobrenadante de un cultivo de <i>L. infantum</i>.</u>	35
3.4.	<u>Manipulación de ADN.</u>	36
3.4.1.	Aislamiento de ADN.	36
3.4.1.1.	Aislamiento de ADN plasmídico.	36
3.4.1.2.	Aislamiento de ADN genómico de <i>L. infantum</i> .	36
3.4.1.3.	Aislamiento de ADN de bazo de ratón.	36
3.4.2.	Electroforesis en gel de agarosa.	36
3.4.3.	Purificación de ADN.	37
3.4.3.1.	Extracción de ADN de gel de agarosa.	37
3.4.3.2.	Purificación por precipitación con etanol.	37
3.4.4.	Clonaje en vectores de expresión.	37
3.4.4.1.	Preparación de los vectores.	39
3.4.4.2.	Ligación.	39
3.4.4.3.	Sistema de clonaje <i>In Fusion</i> ®.	39
3.4.5.	Secuenciación de ADN.	40
3.5.	<u>Expresión en sistema heterólogo y purificación de proteínas recombinantes.</u>	40
3.5.1.	Expresión de proteínas recombinantes.	40
3.5.2.	Purificación por cromatografía de afinidad con níquel.	40

3.5.3.	Cromatografía de exclusión por tamaño molecular.	42
3.6.	<u>Producción y purificación de anticuerpos policlonales.</u>	42
3.7.	<u>Manipulación de proteínas.</u>	44
3.7.1.	Obtención y cuantificación de extractos proteicos totales de <i>Leishmania</i> spp.	44
3.7.2.	Determinación de los niveles de expresión relativa de LiTAT y LiMalDC.	44
3.7.3.	Cuantificación de proteínas purificadas.	45
3.7.4.	Electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE).	45
3.7.5.	Electroforesis en condiciones nativas (<i>Novex® NativePAGE</i>).	45
3.7.6.	Electroforesis bidimensional (2DE).	46
3.7.7.	Identificación de proteínas por espectrometría de masas (MS) MALDI-TOF/TOF.	47
3.8.	<u>Análisis de la localización subcelular de las proteínas de <i>L. infantum</i>.</u>	47
3.8.1.	Inmunofluorescencia indirecta.	47
3.8.2.	Extracción fraccionada de proteínas de <i>L. infantum</i> con digitonina.	47
3.9.	<u>Inmunoprecipitación de LiTAT en extractos de promastigotes.</u>	48
3.10.	<u>Ensayos de actividad.</u>	49
3.10.1.	Transaminación de tirosina <i>in situ</i> .	49
3.10.2.	Deshidrogenación de pHPP <i>in situ</i> .	49
3.10.3.	Análisis de la actividad enzimática de LiTAT recombinante.	50
3.10.4.	Análisis de la actividad enzimática de deshidrogenación con enzimas recombinantes.	50
3.11.	<u>Calorimetría diferencial de barrido (DSF).</u>	50
3.12.	<u>Resolución de la estructura de LiTAT mediante cristalografía de rayos X.</u>	50
3.12.1.	Condiciones de cristalización y de difracción.	50
3.12.2.	Determinación de la estructura de LiTAT.	51
3.13.	<u>Modelado de la estructura de LiMalDC.</u>	51
3.14.	<u>Simulaciones por acoplamiento molecular <i>in silico</i>.</u>	52
3.15.	<u>Evaluación de la protección conferida por LiTAT tras la infección experimental por <i>L. infantum</i>.</u>	52
3.15.1.	Diseño experimental.	52
3.15.2.	Evaluación de la carga parasitaria mediante PCR cuantitativa (qPCR).	53
4.	<u>Resultados.</u>	55
4.1.	<u>Estudio de la secuencia de LiTAT, clonaje y purificación.</u>	57
4.1.1.	Análisis de la secuencia de LiTAT.	57
4.1.2.	Clonaje, expresión y purificación de LiTAT en condiciones nativas.	59
4.1.3.	Estabilidad de LiTAT y LiTAT_Tr en función de la temperatura.	62
4.2.	<u>Expresión y regulación de LiTAT en el ciclo biológico de <i>L. infantum</i>.</u>	63

4.2.1.	Expresión de TAT en promastigotes.	63
4.2.2.	Expresión de LiTAT en las formas infectivas de <i>L. infantum</i> .	65
4.2.3.	Función del extremo N-terminal en la degradación de la proteína LiTAT.	67
4.2.4.	Expresión de LiTAT en presencia de MG-132.	68
4.2.5.	Influencia del suero bovino fetal (SBF) en la expresión de LiTAT en promastigotes de <i>L. infantum</i> en cultivo axénico.	69
4.2.5.1.	Efecto de la suplementación con suero en la expresión de LiTAT.	69
4.2.5.2.	Efecto de la supresión del suero del medio de cultivo de promastigotes en la expresión de LiTAT.	70
4.2.6.	Estudio del efecto de la delección de nutrientes del medio de cultivo sobre la expresión de LiTAT.	72
4.3.	<u>Localización subcelular de LiTAT.</u>	74
4.4.	<u>Estudios de actividad enzimática.</u>	76
4.4.1.	Actividad enzimática específica de LiTAT y LiTAT_Tr frente a distintos oxoácidos.	76
4.4.2.	Actividad enzimática específica de LiTAT en función del pH.	77
4.5.	<u>Estudio de la ruta metabólica en la que participa LiTAT.</u>	77
4.5.1.	Actividad tirosina aminotransferasa en promastigotes de <i>L. infantum</i> .	77
4.5.2.	Detección del producto final del catabolismo de <i>L. infantum</i> .	78
4.5.3.	Identificación de proteínas que interaccionan con LiTAT mediante inmunoprecipitación.	79
4.5.4.	Purificación de enzimas con capacidad de reducir oxoácidos aromáticos en <i>L. infantum</i> .	80
4.5.5.	Perfil de expresión de LiMalDC en el ciclo biológico de <i>L. infantum</i> .	83
4.5.6.	Localización subcelular de LiMalDC.	85
4.5.7.	Modelado de la proteína LiMalDC y predicción del acoplamiento molecular de pHPP en el centro activo.	86
4.6.	<u>Ensayo de protección de ratones de la cepa BALB/c con LiTAT frente a la infección experimental con <i>L. infantum</i>.</u>	87
4.7.	<u>Análisis estructural y funcional de la proteína LiTAT.</u>	88
4.7.1	Resolución de la estructura de LiTAT mediante cristalografía de rayos X.	88
4.7.2	Estructura de LiTAT.	89
4.7.3.	Configuración del centro activo de LiTAT con piridoxal fosfato.	90
4.7.4	Modificaciones estructurales en el centro activo en el primer paso de transaminación de la tirosina.	92
4.7.5.	Simulación de la disposición adoptada por los oxoácidos en el segundo paso de la reacción de transaminación.	93

4.8.	<u>Predicción de un grupo farmacóforo de LiTAT.</u>	94
5.	<u>Discusión.</u>	97
5.1.	<u>Expresión y localización subcelular de la tirosina aminotransferasa en <i>L. infantum</i> y su regulación.</u>	99
5.2.	<u>Función del catabolismo de aminoácidos aromáticos en el metabolismo de <i>Leishmania</i>.</u>	101
5.3.	<u>Relación estructura-función de LiTAT.</u>	103
5.3.1.	Estudio de la reacción de transaminación en LiTAT mediante simulación por acoplamiento molecular.	106
5.4.	<u>Aplicaciones de la LiTAT en la búsqueda de nuevas estrategias para el control de la leishmaniasis.</u>	107
5.4.1.	Evaluación de la respuesta protectora inducida por LiTAT en el modelo de ratón frente a la infección experimental por <i>L. infantum</i> .	107
5.4.2.	<u>Diseño racional de inhibidores que bloquean el centro activo de LiTAT.</u>	108
6.	<u>Conclusiones.</u>	111
7.	<u>Bibliografía.</u>	117

Summary

Leishmaniasis is a disease caused by species of the genus *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) with an estimated annual incidence comprised between 900,000 and 1.8 million cases. *L. infantum* is the etiological agent responsible for zoonotic visceral leishmaniasis being the dog the main reservoir in the Mediterranean basin. *Leishmania spp.* develops a digenetic biological life cycle which alternates the extracellular promastigote form within the midgut of the vector *Phlebotomus* with the immobile intramacrophage amastigote stage in the mammalian host. Current treatment options of leishmaniasis are limited due to their toxicity, high cost and the development of increasing resistances and relapses. In this work, *L. infantum* tyrosine aminotransferase (LiTAT) has been identified as an important enzyme in the metabolism of the parasite. LiTAT is a cytoplasmic enzyme involved in the first step of the aromatic amino acids degradation pathway which is based on the transamination of the amino group of an amino acid to an oxoacid. As in *T. cruzi*, the end-product of the tyrosine degradative pathway (*p*-hydroxyphenyl lactic acid), which has been associated to the pathogeny in other trypanosomatids, is excreted in big amounts by promastigotes in axenic culture indicating a highly activated pathway. The percentage of sequence identity between LiTAT and the mammalian orthologue is 37% and the reactivity is rather different between both orthologues. Expression of the protein was confirmed in both, the amastigote and in the early-logarithmic stage of promastigotes. The iron is required to initiate the expression of LiTAT in early-logarithmic stage. On the other hand, the degradation of LiTAT can be avoided by the deletion of the first 38 amino acids located in the N-terminal and by the inhibition of the subunit 26S in the proteasome. Within the stationary stage of promastigotes it is only expressed in the more infective metacyclic subpopulation. Moreover LiTAT is over-expressed in a nitric oxide resistant strain of *L. infantum* (*chagasi*). This over-expression may be explained because LiTAT seems to be able to interact with the malic decarboxylase enzyme, which is responsible, among others, of the pyruvate synthesis from malate producing NADPH which is necessary for the protection against the oxidative stress. All these reasons make LiTAT a good candidate for the development of new inhibitors. Consequently the PLP-bonded structure of this enzyme was solved by X-ray crystallography at 2.35 Å of resolution. A comprehensive basis for the mechanism of the transamination in the active center allowed a structure-based development of a pharmacophore group for the identification of new molecules which may inhibit the activity of the enzyme.

Resumen

La leishmaniasis es una enfermedad causada por distintas especies del género *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) con una incidencia estimada anual de entre 900.000 y 1,8 millones de casos. *L. infantum* es el agente etiológico responsable de la leishmaniasis visceral zoonótica en la que el perro es el principal reservorio en la cuenca mediterránea. *Leishmania* spp. tiene un ciclo digenético en el que se alternan el estadio promastigote extracelular en el tubo digestivo del vector, *Phlebotomus*, con el estadio amastigote inmóvil en el interior de los macrófagos del hospedador mamífero. La terapia actual frente a la leishmaniasis está muy limitada debido a su toxicidad, elevado coste y al desarrollo de resistencias y recidivas. En el presente trabajo, la tirosina aminotransferasa de *L. infantum* (LiTAT) se ha identificado como una enzima importante en el metabolismo del parásito. LiTAT es una proteína citoplasmática que está involucrada en el primer paso de la ruta de degradación de aminoácidos aromáticos, el cual consiste en la transaminación del grupo amino desde un aminoácido a un oxoácido. Como ocurre en *T. cruzi*, el producto final de la ruta de degradación de la tirosina (el ácido *p*-hidroxifenil láctico), que se ha asociado a la patogenia de la enfermedad en otros tripanosomátidos, es excretado en gran cantidad por los promastigotes al medio de cultivo, lo que es indicativo de una ruta metabólica muy activa. El porcentaje de identidad de secuencia de LiTAT con la proteína ortóloga en mamíferos es del 37% y la especificidad frente a los sustratos oxoácidos entre ambas es muy distinta. La expresión de la proteína se confirmó tanto en promastigotes en fase logarítmica temprana, como en amastigotes. El hierro es un factor necesario para el inicio de la expresión de LiTAT en fase logarítmica temprana. Por otro lado, la degradación de LiTAT puede ser eludida por la delección del extremo N-terminal de 38 aminoácidos y por la inhibición de la subunidad 26S del proteasoma. En promastigotes en fase estacionaria, la proteína sólo se expresa en la subpoblación metacíclica con mayor capacidad infectiva. Además, LiTAT se sobre-expresa en una cepa de *L. infantum* (*chagasi*) resistente a óxido nítrico. Dicha sobre-expresión podría explicarse por su interacción con la malato descarboxilasa, responsable, entre otras, de la síntesis de piruvato a partir de malato produciendo NADPH, requerido en la protección frente a estrés oxidativo. Todo esto hace de LiTAT una buena diana terapéutica para el desarrollo de nuevos compuestos inhibidores. Por ello, mediante cristalografía de rayos X, se ha resuelto la estructura de la proteína LiTAT a una resolución de 2,35 Å. Esto ha permitido dilucidar el mecanismo de reacción que se produce durante el proceso de transaminación en el centro activo de la enzima y ha permitido el desarrollo de un grupo farmacóforo con el que poder identificar nuevas moléculas que podrían inhibir la actividad de la enzima.

Abreviaturas

2DE	Electroforesis bidimensional
ACN	Acetonitrilo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ABC	<i>ATP-binding cassette</i>
AEE	Actividad enzimática específica
ALAT	Alanina aminotransferasa
ARAT	Aminotransferasa aromática
ARN	Ácido desoxirribonucleico
ASAT	Aspartato aminotransferasa
ATP	Adenosina trifosfato
BCAT	Aminotransferasa de cadena ramificada
BSA	Albúmina de suero bovino
CHAPS	1-propanosulfonato de 3-(3-colamidopropil)-dimetilamonio
cGAPDH	Gliceraldehido fosfato deshidrogenasa citosólica
CL	Leishmaniasis cutánea
Ct	<i>Cycle threshold</i>
CV	Coeficiente de variación
D2-HADH	Hidroxiácido deshidrogenasa D2-específica
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol
DCL	Leishmaniasis cutánea difusa
DMP	Dimetil-pimelimidato
DMSO	Dimetil sulfóxido
DSF	Calorimetría diferencial de barrido
DTT	Ditiotreitol
EC	<i>Enzyme Commission</i>
EDTA	Ácido etildiaminotetraacético
GC	Cromatografía de gases
gGAPDH	Gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa glicosomal
GIPLs	Fosfolípidos de glicosilinositol
GOI	Gen de interés
GOR	Gen de referencia
GP63	Glicoproteína 63
GPI	Glicosilfosfatidilinositol

HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
IEF	Isoelectroenfoque
IFI	Inmunofluorescencia indirecta
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleucina
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
IUBMB	Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular
K _{av}	Coefficiente de distribución
kDa	Kilodalton
KMTB	α -cetometiltiobutirato
kpb	Kilobases
LACK	Receptor homólogo en <i>Leishmania</i> activado por kinasa-C
LB	<i>Luria-Bertani</i>
LdTAT	Tirosina aminotransferasa de <i>L. donovani</i>
LFR	Reductasa férrica
L-HADH	Hidroxiácido deshidrogenasa L-específica
L-MEEP	L-metionina etilpiruvato
LicMDH	Malato deshidrogenasa citosólica de <i>L. infantum</i>
LiD2-HADH	Hidroxiácido deshidrogenasa D2-específica de <i>L. infantum</i>
LiMalDC	Enzima málica de <i>L. infantum</i>
LiTAT	Tirosina aminotransferasa de <i>L. infantum</i>
LiTAT_Tr	Tirosina aminotransferasa truncada de <i>L. infantum</i>
LPG	Lipofosfoglicano
MCL	Leishmaniasis mucocutánea
MLEE	Electroforesis de enzimas multilocus
Mr	Peso molecular estimado por exclusión molecular
MS	Espectrometría de masas
MVT	Túbulo multivesicular
Mw	Peso molecular
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NHS	N-hidroxisuccinimida
Ni-NTA	Matriz de ácido nitrilotriacético-níquel
NO	Óxido nítrico
PAGE-SDS	Electroforesis en gel de agarosa con SDS
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PHIL	Biblioteca de imágenes de salud pública
pHPL	Ácido para-hidroxifenil láctico

pHPP	Ácido para-hidroxifenil pirúvico
pI	Punto isoeléctrico
PLP	Piridoxal fosfato
PKDL	Leishmaniasis dérmica post-Kala-azar
PMA	<i>Phorbol myristate acetate</i>
PMP	Piridoxamina fosfato
PNA	Aglutinina de cacahuete
PNA ⁻	Subpoblación de promastigotes no aglutinantes con PNA
PNA ⁺	Subpoblación de promastigotes aglutinantes con PNA
PSG	Gel secretado por promastigotes
PTS	<i>Peroxisomal-targeting-signal</i>
Q	Cantidad de ADN
Qn	Cantidad de ADN normalizada
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
RAPD	<i>Random Amplification of Polymorphic DNA</i>
RE	Retículo endoplasmático
RMSD	<i>Root-mean square deviation</i>
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SBF	Suero bovino fetal
SD	Desviación estándar
SEC	Exclusión molecular
SNP	Polimorfismo de un solo nucleótido
TA	Temperatura ambiente
TAE	Tampón Tris-acetato
TAT	Tirosina aminotransferasa
TCA	Ciclo de los ácidos tricarboxílicos
TH	Temperatura de hibridación
THB	<i>Trypanosome Homogenization Buffer</i>
THF	Tetrahidrofolato
tRE	Retículo endoplasmático de transición
UDO	Unidades de densidad óptica
Ve	Volumen de elución
VL	Leishmaniasis visceral

1

Introducción

1.1. Leishmaniasis

Se denomina leishmaniasis a la enfermedad transmitida por vectores artrópodos de la familia Phlebotominae que afecta a vertebrados mamíferos y cuyos agentes etiológicos son protozoos del género *Leishmania* (orden Kinetoplastida, familia Trypanosomatidae). Dependiendo de la especie y del estado inmunológico del hospedador, se distinguen tres manifestaciones clínicas principales: leishmaniasis cutánea (CL), mucocutánea (MCL) y visceral (VL). Otras menos frecuentes son la leishmaniasis cutánea difusa (DCL) y la leishmaniasis dérmica post-*kala-azar* (PKDL). *L. infantum* es el agente etiológico responsable de la leishmaniasis visceral zoonótica en la cuenca mediterránea, donde el perro es el reservorio principal. La leishmaniasis causada por *L. donovani* se considera una antroponosis, ya que el reservorio es el hombre.

1.1.1. Epidemiología

Están descritas al menos treinta especies del género *Leishmania*, de las cuales más de 20 son patógenas para el ser humano. La leishmaniasis se considera endémica en 98 países. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), hay una incidencia anual de 1,3 millones de nuevos casos en todo el mundo, de los cuales 300.000 son de VL. El 90% de los nuevos casos de leishmaniasis visceral a nivel mundial se registran en siete países (Bangladesh, Brasil, Etiopía, India, Nepal, Sudán y Sudán del Sur) (OMS, 2012). Anualmente se registran entre 20.000 y 40.000 casos de mortalidad por VL y la población en riesgo es de 310 millones de personas. La distribución geográfica de la leishmaniasis (Figura 1) se ha expandido desde 1993 debido, principalmente, al movimiento de poblaciones (Desjeux, 2001, Aagaard-Hansen y col., 2010). También se ha registrado un incremento en el número global de casos de VL debido a distintos factores, como el escaso control en las áreas de transmisión activa, la aparición de resistencias frente a los fármacos habituales, la deforestación y la proximidad y abundancia de reservorios en el ambiente doméstico, entre otros factores. Con respecto a la VL, los cánidos son los reservorios de la especie *L. infantum* en el Viejo Mundo (África, Asia y Europa) y de *L. chagasi* (considerado sinónimo de *L. infantum*) en el Nuevo Mundo (América del Sur y Central). En el Viejo Mundo la VL se localiza en toda la cuenca mediterránea, África, Oriente Medio y el sur de Asia (Figura 2). Hasta 2012, se habían registrado casos de co-infección de VIH con *Leishmania* spp. en 35 países con un aumento notable en zonas con difícil acceso a una terapia anti-retroviral (Alvar y col., 2008).

En España, la leishmaniasis causada por *L. infantum* es una enfermedad endémica, presente en la mayor parte del territorio peninsular e Islas Baleares. El zorro (*Vulpes vulpes*) mantiene el ciclo selvático de transmisión y el perro (*Canis familiaris*) el ciclo doméstico. Las especies de vector implicadas en la transmisión son *Phlebotomus perniciosus* y *P. ariasi*. En julio de 2009 se detectó un brote de leishmaniasis en el suroeste de la Comunidad de Madrid causado por *L. infantum* (Jimenez y col., 2013), durante el cual se aumentó cinco veces la incidencia de la enfermedad en Madrid. Debido a este brote, se ha propuesto que la liebre (*Lepus granatensis*) podía actuar como reservorio manteniendo un ciclo selvático alternativo de transmisión (Molina y col., 2012).

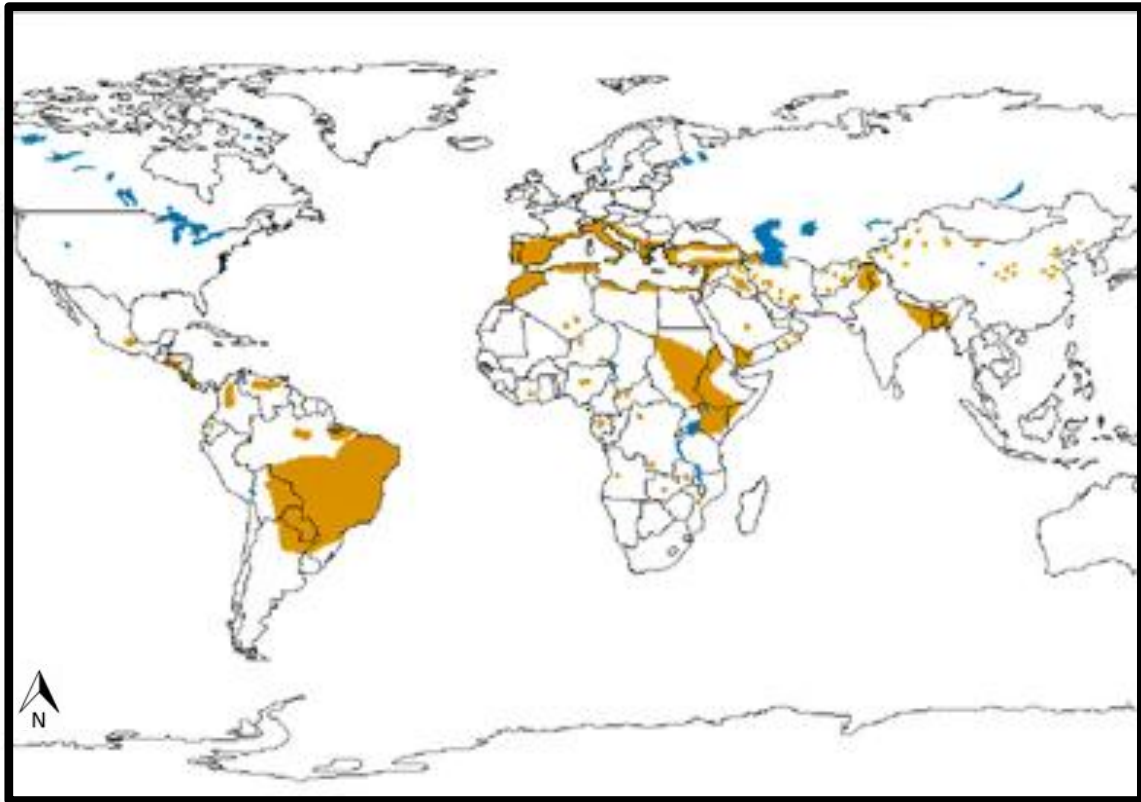


Figura 1. Distribución de VL a nivel mundial. (en amarillo se indican las zonas en donde la VL es endémica) (adaptado de la OMS, Octubre 2010).

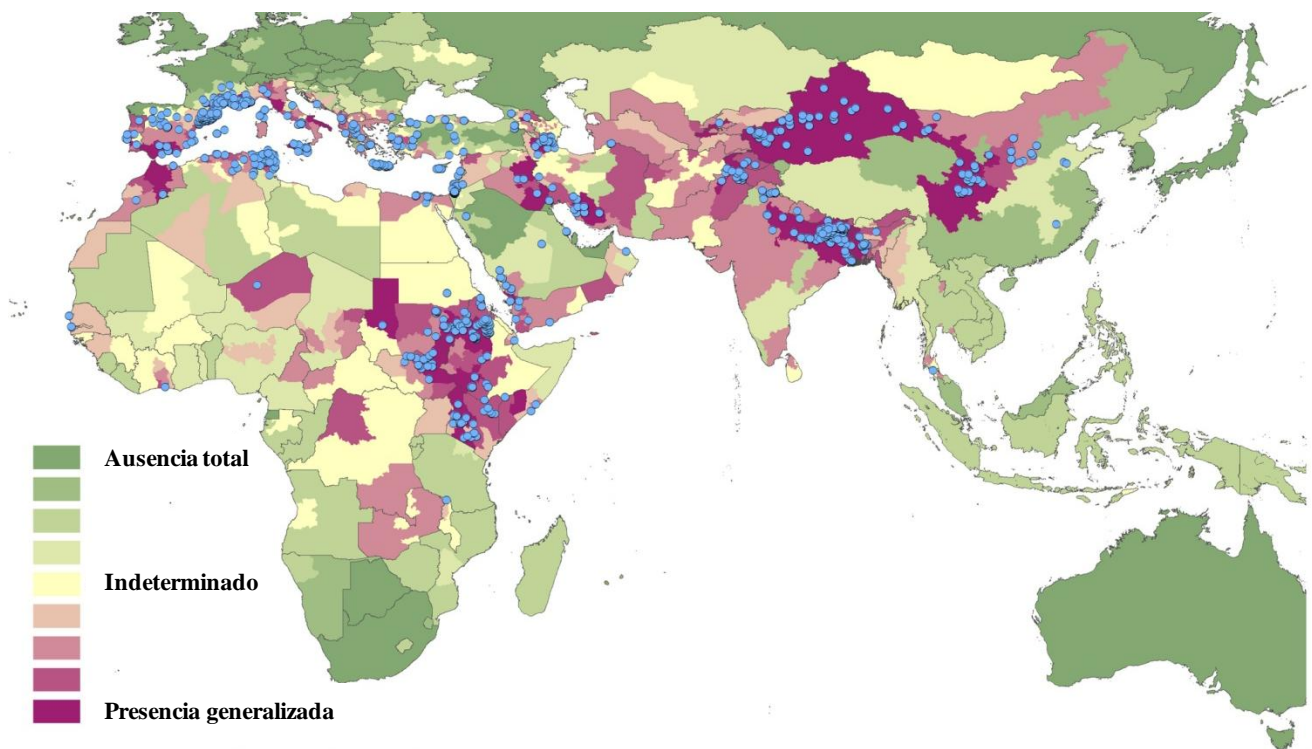


Figura 2. Distribución de VL en el viejo mundo (Pigott y col., 2014). Las estimaciones nacionales de presencia de VL oscilan desde ausencia total (en verde) a presencia generalizada (en morado). Los puntos azules indican los núcleos de casos reportados de VL.

1.1.2. Manifestaciones clínicas.

1.1.2.1. Leishmaniasis humana.

La leishmaniasis presenta un cuadro clínico variable, que se diferencia en función de la especie del parásito y los órganos afectados en el hombre (Figura 3):

- Leishmaniasis cutánea (CL): cursa generalmente con la aparición, en el lugar de la picadura, de pápulas eritematosas que se ulceran y que tienden a curarse espontáneamente, en algunos casos persistiendo en forma de nódulos o placas. Las especies causantes de esta forma clínica en el Viejo Mundo son *L. major*, *L. tropica* y *L. aethiopica*, y con menor frecuencia, *L. infantum* y *L. donovani* (Rioux y Lanotte, 1990). En el Nuevo Mundo, las especies implicadas son todas las pertenecientes al subgénero *Viannia* y dentro del subgénero *Leishmania*, las pertenecientes al complejo *L. mexicana*, y por otro lado *L. chagasi*.
 - Leishmaniasis cutánea difusa (DCL): cursa con la aparición de lesiones no ulcerosas y diseminadas en la piel. Esta forma es crónica y con frecuentes recidivas. Está causada por *L. aethiopica* en el Viejo Mundo y por las especies del complejo *L. mexicana* en el Nuevo Mundo (Convit y col., 1972).
- Leishmaniasis mucocutánea (MCL): se caracteriza, en primer lugar, por la aparición de úlceras cutáneas. A continuación, los parásitos se diseminan desde la piel, a la mucosa nasofaríngea por vía linfática o hematógena provocando la destrucción de ésta. La MCL está causada principalmente por las especies del subgénero *Viannia* en el Nuevo Mundo (*L. (V) braziliensis* y con menor frecuencia por *L. (V) panamensis* y *L. (V) guyanensis*) (David y Craft, 2009).
- Leishmaniasis visceral (VL): también conocida como *Kala-azar*, es la forma más grave de la enfermedad y es mortal sin tratamiento. Está causada por especies del complejo *L. donovani* (*L. infantum* y *L. donovani*). Presenta una amplia variedad de síntomas clínicos incluyendo fiebre irregular, pérdida de peso, hepatoesplenomegalia (con predominio de esplenomegalia) y pancitopenia (que incluye anemia, trombocitopenia, leucopenia y neutropenia junto con una relativa linfocitosis y monocitosis) asociada con hipergammaglobulinemia e hipoalbuminemia (Herwaldt, 1999).
 - Leishmaniasis dérmica post-Kala-azar (PKDL): es una secuela de VL producida tras su remisión y causada por *L. donovani*. Se producen lesiones maculares, maculopapulares y nodulares, que se inician normalmente alrededor de la boca (David y Craft, 2009).

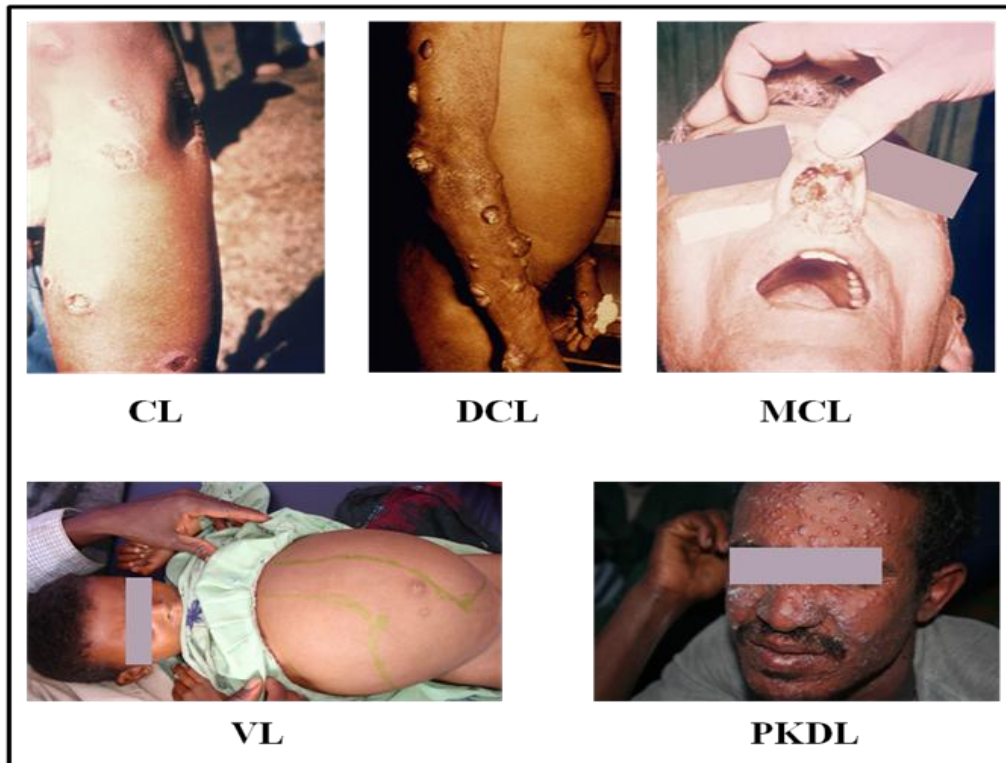


Figura 3. Manifestaciones clínicas de la leishmaniasis humana. CL, leishmaniasis cutánea; DCL, leishmaniasis cutánea difusa; MCL, leishmaniasis mucocutánea; VL, leishmaniasis visceral o *Kala-azar*; PKDL, leishmaniasis dérmica post-*Kala-azar*. Fotografías obtenidas de la Biblioteca de Imágenes de Salud Pública (PHIL) (Centro para el Control y Prevención de Enfermedades, Georgia, Estados Unidos) y de la OMS.

1.1.2.2. Leishmaniasis canina.

En el perro, a diferencia del hombre, no hay distintos tipos de leishmaniasis canina sino que cursa con sintomatología cutánea y visceral variable (Ferrer, 1989). La duración del periodo de incubación oscila entre dos meses y varios años. En la etapa temprana de la enfermedad aparecen síntomas inespecíficos, como apatía, astenia, pérdida de peso y conjuntivitis, entre otros. Durante el periodo de patencia, pueden aparecer los siguientes síntomas característicos: lesiones cutáneas, onicogriposis, anorexia, fiebre, linfadenopatías, hepatomegalia, esplenomegalia, palidez de las mucosas y atrofia muscular (Figura 4). En la fase final de la enfermedad, se produce caquexia y muerte del animal por fallo hepático o renal.



Figura 4. Manifestaciones clínicas de la leishmaniasis canina.

1.1.3. Diagnóstico de la leishmaniasis.

La detección de la enfermedad se realiza principalmente por métodos etiológicos e inmunológicos. Para el diagnóstico etiológico las muestras se obtienen mediante aspirado de ganglio linfático y observación al microscopio. En ocasiones, para el diagnóstico de PKDL se utilizan biopsias cutáneas o aspirados de médula ósea (procedimiento más invasivo) (Osman y col., 1998). Los métodos de diagnóstico utilizados para cribados a gran escala son la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o la hibridación con sondas de ADN (*Dot-blot*), entre otras.

Como técnicas de inmunodiagnóstico para la detección de anticuerpos circulantes frente a proteínas de *Leishmania* presentes en la sangre de paciente infectados, se utilizan la inmunofluorescencia indirecta, los test de aglutinación directa o el enzoinmunoensayo (ELISA) con extracto soluble de *Leishmania*. Para el diagnóstico de la leishmaniasis canina, se utilizan los métodos de diagnóstico inmunológico mencionadas arriba a partir de biopsias de ganglios linfáticos, bazo o médula ósea (Mancianti y Meciani, 1988, Badaro y col., 1993).

También se ha desarrollado un método de xenodiagnóstico indirecto que se basa en la detección de parásitos en flebotomos, infectados tras ingerir sangre de pacientes con leishmaniasis (Molina y col., 1994).

1.1.4. Interacción entre *Leishmania* y el hospedador: la respuesta inmunitaria.

Cuando los promastigotes son inoculados en la dermis del hospedador durante la ingesta de sangre del flebotomo, se inicia la activación de la respuesta inmunitaria innata. En primer lugar, se produce la opsonización por los anticuerpos naturales (IgM) del hospedador, lo que inicia la activación de la vía clásica del sistema del complemento. Se ha propuesto que los promastigotes metacíclicos podrían evadir la lisis mediada por el sistema del complemento probablemente debido al cambio en la composición de la molécula de lipofosfoglicano (LPG) en esta subpoblación, lo que impediría el anclaje de las subunidades C5b-C9 (Puentes y col., 1989). En el caso de que los promastigotes que evaden la acción del complemento sean internalizados por los fagocitos, se podría iniciar la respuesta inmunitaria adaptativa en la que estos fagocitos migran hacia los órganos linfoides secundarios, donde presentan el antígeno a las células T colaboradoras vírgenes (Walker y col., 2014).

En la infección de *L. major* en ratón existe una división clara entre las respuestas Th1 y Th2 que determina la susceptibilidad del hospedador (Gumy y col., 2004). La resistencia es conferida por las células Th1 y la susceptibilidad se produce por un incremento en la respuesta Th2. Durante la respuesta Th1, se produce una alta concentración de interleuquina-12 (IL-12) por macrófagos, leucocitos polimorfonucleares, células dendríticas y linfocitos B. Esta citoquina induce la producción de interferón gamma (IFN- γ) por los linfocitos T CD4⁺ y T CD8⁺ y por las células NK (Scharton-Kersten y col., 1995). El IFN- γ producido induce la activación de los macrófagos para la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y óxido nítrico (NO). Por otro lado, en la respuesta Th2, manifestada por la presencia de IL-10, IL-4, IL-13, entre otras, y la alta producción de anticuerpos, se muestra una mayor susceptibilidad a la infección en ratones (Sacks y Noben-Trauth, 2002). En la leishmaniasis humana, la respuesta inmunitaria varía en función del hospedador y del cuadro clínico. Frente a CL, existe una predominancia clara de la respuesta Th1. Sin embargo, no existe una dicotomía clara en el tipo de linfocitos T que participan (Ajadary y col., 2000). En VL, se ha visto por estudios realizados con células T de pacientes con leishmaniasis (Mary y col., 1999) y a nivel transcripcional (Ghalib y col., 1993), el aumento de IL-10 parece ser uno de los

factores más importantes para el desarrollo de la patogenia de la enfermedad, mientras que la citoquina IL-12 favorece la linfoproliferación y la producción de IFN- γ (Bacellar y col., 2000). En la infección en el perro, la respuesta Th1 parece predominar en perros asintomáticos, mientras que las citoquinas Th2 podrían estar relacionadas con una progresión de la enfermedad (Barbieri, 2006). Sin embargo, en este caso no hay una dicotomía tan clara como en el ratón, sino que se produce un balance entre las respuestas Th1 y Th2.

1.1.5. Control de la enfermedad.

1.1.5.1. Control del vector y del reservorio.

Una de las medidas más eficaces para controlar la leishmaniasis es a través del control del vector. Para ello, se utilizan piretroides como por ejemplo la resmetrina (Tetreault y col., 2001). Este tipo de insecticidas se usan tanto en interiores (lugares de reposo, contornos de ventanas y mosquiteras) como en exteriores (perreras, porches, etc.) dada su baja toxicidad en mamíferos (Alexander y Maroli, 2003). Para la eliminación de la forma larvaria del insecto-vector, una alternativa es la introducción en los criaderos potenciales de flebotomos adultos infectados con la bacteria larvicida *Bacillus sphaericus* (Robert y col., 1997).

En las leishmaniasis zoonóticas, para limitar la incidencia de la enfermedad se ha de controlar el reservorio. Para ello, se hace un seguimiento del tratamiento en los perros domésticos infectados (Moreno y Alvar, 2002) y se realizan controles de los perros vagabundos, entre los que existe un alto porcentaje que, a pesar de no mostrar signos clínicos, son seropositivos frente a *Leishmania* (Miro y col., 2007).

1.1.5.2. Vacunas frente a la leishmaniasis.

El desarrollo de una vacuna específica frente a la leishmaniasis es uno de los factores que podría contribuir de forma decisiva en el control de la enfermedad. El objetivo para el desarrollo de vacunas es la obtención de una inmunidad de larga duración. El desarrollo de vacunas de primera generación fue la primera forma de vacunación utilizada (Nadim y col., 1983). Sin embargo, el uso de células vivas atenuadas se terminó desechando debido a los problemas de seguridad (Handman, 2001). También se han elaborado vacunas utilizando promastigotes autoclavados que, aunque mostraban una respuesta protectora al principio, su nivel de eficacia descendía con el tiempo (Antunes y col., 1986, Sharifi y col., 1998). Como vacuna de segunda generación frente a la leishmaniasis canina se ha comercializado una vacuna consistente en el ligando de fucosa-manosa purificado a partir de *L. donovani* y que ha sido comercializada en Brasil con el nombre de *Leishmune*[®] (Dantas-Torres, 2006).

Existen dos vacunas aprobadas por las agencias reguladoras para el control de la leishmaniasis canina. Una de ellas ha sido aprobada en Europa (*CaniLeish*[®], Virbac, Francia) (Moreno y col., 2012) y la otra en Brasil (*LeishTec*[®]) (Otranto y Dantas-Torres, 2013). Sin embargo, no se dispone de vacunas autorizadas para prevenir la leishmaniasis humana. Por otro lado, la utilización de vacunas de tercera generación como plásmidos portadores, ha permitido el ensayo del gen LACK como antígeno (análogo de la proteína quinasa C activada), con el que se ha desarrollado una estrategia de vacunación frente a *L. major* o *L. infantum* en el modelo de ratón (Gonzalo y col., 2002, Pinto y col., 2004, Gomes y col., 2007) y en perros (Ramos y col., 2008, Ramos y col., 2009). Recientemente la agencia europea del medicamento a través del Comité de Medicamentos Veterinarios ha recomendado la autorización para la comercialización de una nueva vacuna de segunda generación frente a la leishmaniasis canina

cuya sustancia activa es la proteína Q recombinante purificada, la cual es capaz de inducir una disminución en la carga parasitaria y reducir los síntomas en perros (Carcelen y col., 2009).

1.1.5.3. Tratamiento.

El tratamiento de la leishmaniasis depende de varios factores, como la especie de parásito implicada y la forma de la enfermedad. Dado el aumento de las resistencias y las recidivas, así como la toxicidad asociada a algunos de los tratamientos utilizados, se requiere la búsqueda de nuevas dianas farmacológicas para el desarrollo de nuevos compuestos leishmanicidas.

- Antimoniales pentavalentes.

Los antimoniales pentavalentes son el tratamiento de primera elección para cualquier tipo de leishmaniasis, aunque actualmente su uso está más restringido debido a la aparición desde hace años de cepas resistentes (Lira y col., 1999). Los antimoniales se empezaron a utilizar en su forma trivalente a principios del siglo XX, pero dada su toxicidad, a mediados de siglo se pasaron a utilizar como pentavalentes. En la actualidad se presentan dos formulaciones: el antimoniato de meglumina (*Glucantime*®) y el estibogluconato sódico (*Pentostam*®). Ambas se consideran similares en términos de eficacia clínica, efectos secundarios, farmacocinética y mecanismos de acción (Chulay y col., 1988). La administración se realiza por vía intramuscular o intravenosa. Su mecanismo de acción está basado en la capacidad del antimonio trivalente de bloquear los grupos sulfhidrilo, inhibiendo de esta manera las enzimas tripanotona reductasa, fosfofructoquinasa y topoisomerasas, así como la β -oxidación de los ácidos grasos. La aparición de resistencias está mediada por distintos mecanismos, entre los que se incluyen la eliminación del complejo antimonio-tiol a través de transportadores de tipo ATP-asas y el secuestro de dicho complejo en vacuolas intracelulares que posteriormente son exocitadas (Legare y col., 2001). Es frecuente la aparición de efectos secundarios tales como náuseas, vómitos, astenia, mialgia, y diarreas así como hepatotoxicidad y cardiotoxicidad.

- Anfotericina B.

Es un antibiótico poliénico con capacidad de alterar la permeabilidad de las membranas celulares por su capacidad de interaccionar preferentemente con el ergosterol (esterol mayoritario en las membranas de *Leishmania*) frente al colesterol de las membranas de mamíferos (Ramos y col., 1996). La administración vía intravenosa de anfotericina B utilizando desoxicolato sódico como agente emulsionante (*Fungizone*®) tiene una tasa de curación cercana al 100%, pero los numerosos efectos adversos y la gravedad de los mismos disminuyen la eficiencia del tratamiento (Mishra y col., 1991). No obstante, la formulación liposomal (*AmBisome*®), en la cual los liposomas están formados por fosfatidilcolina, fosfatidilglicerol y colesterol, disminuye la toxicidad debido a que se produce un retardo en la liberación de la anfotericina B y ésta se dirige específicamente a los órganos afectados. La elevada tasa de curación con la formulación liposomal hace que sea el tratamiento de elección para la VL en países desarrollados. Sin embargo, su elevado coste de producción y mantenimiento, hace que su uso en países en desarrollo sea complicado. Por otro lado, se han identificado aislados clínicos de *L. donovani* capaces de resistir la toxicidad causada por el fármaco. Esta resistencia se basa principalmente en la capacidad de los parásitos de producir esteroides modificados en lugar de ergosterol (Purkait y col., 2012).

- Miltefosina.

Se trata de una alquilfosfocolina utilizada en un principio como fármaco antitumoral. Fue el primer fármaco de administración oral utilizado frente a la leishmaniasis humana y se comercializa como *Impavido*® (leishmaniasis humana) y *Milteforan*® (leishmaniasis canina). La tasa de curación es de aproximadamente un 94% en humanos y su mecanismo de acción se basa en la capacidad de interferir en el metabolismo de los fosfolípidos y de inhibir la biosíntesis de glucolípidos y glucoproteínas, así como de inducir muerte celular (Lux y col., 2000, Sundar y Rai, 2002). Una de las ventajas de este tratamiento son los escasos efectos secundarios que presenta. Sin embargo, la acumulación del fármaco en los tejidos durante al menos siete días facilita la aparición de resistencias, las cuales se han relacionado en *L. donovani* con un polimorfismo de nucleótido simple (SNP) en el gen de la proteína transportadora de miltefosina (Cojean y col., 2012).

- Paromomicina o aminosidina.

Es un aminoglucósido aislado de distintas especies del género *Streptomyces* y que se administra vía intramuscular u oral. Su mecanismo de acción consiste en la inhibición de la síntesis de proteínas por su unión al ribosoma del parásito (Fernandez y col., 2011). La paromomicina se ha usado especialmente en CL y, dado que hasta el momento ha tenido un uso limitado para el tratamiento de VL debido a la existencia de otros tratamientos, no se han descrito casos clínicos de resistencias a este antibiótico. La administración tópica de paromomicina, con o sin gentamicina, para el tratamiento de CL se encuentra en fase de desarrollo (Ben Salah y col., 2013).

- Pentamidina.

La pentamidina (*Lomidine*®) es una diamidina que se ha utilizado como fármaco de segunda línea para el tratamiento de la leishmaniasis durante casi 40 años. Su mecanismo de acción no está claro, aunque se ha sugerido que es por la capacidad del compuesto de inhibir la síntesis de poliaminas y en su capacidad para alterar el potencial de la membrana mitocondrial (Bray y col., 2003). El desarrollo de resistencias frente a la pentamidina en *Leishmania* parece estar relacionado con la sobre-expresión del gen de la proteína de resistencia a pentamidina 1 (PRP1), un transportador de la familia ABC (Coelho y col., 2007).

- Sitamaquina.

Es una 8-aminoquinoleína análoga a la primaquina, utilizada en el tratamiento de la malaria. La sitamaquina es capaz de provocar un colapso en el potencial de membrana de la mitocondria. Actualmente, su eficacia leishmanicida se está estudiando en ensayos clínicos. Su baja vida media favorece que no haya resistencias (Loiseau y col., 2011).

- Alopurinol.

Se utiliza para el tratamiento de la leishmaniasis canina exclusivamente (*Zyloric*®). Al tratarse de un isómero de la hipoxantina, inhibe competitivamente a la xantina oxidasa, bloqueando la síntesis de purinas (Nelson y col., 1979). Además actúa como inmunomodulador. Se utiliza de forma aislada o conjuntamente con los antimoniales pentavalentes (Martinez y col., 1988).

- Azoles.

Son un grupo de antifúngicos que inhiben la enzima C14- α -desmetilasa la cual participa en la ruta de síntesis de ergosterol en *Leishmania*. Los estudios que se han llevado a cabo hasta el momento, muestran resultados contradictorios y la efectividad del tratamiento es variable (Berman, 1981, Rangel y col., 1996).

1.2. El género *Leishmania*.

1.2.1. Taxonomía y filogenia.

Los protozoos responsables de la leishmaniasis pertenecen al género *Leishmania* y fueron descritos por primera vez por Leishman en 1903 (Handman, 2001). La clasificación taxonómica del género *Leishmania* es la siguiente (Chang y col., 1985, Rioux y col., 1990).

Dominio	Eukaryota (Whittaker y Margulis, 1978)
Reino	Protista (Haeckel 1866)
Subreino	Protozoa (Goldfuss 1817)
Filo	Sarcomastigophora (Honigberg y col., 1964)
Subfilo	Mastigophora (Deising, 1866)
Clase	Zoomastigophorea (Calkins, 1909)
Orden	Kinetoplastida (Honigberg y col., 1964)
Suborden	Trypanosomatina (Kent, 1880)
Familia	Trypanosomatidae (Döflein, 1901)
Género	<i>Leishmania</i> (Ross, 1903)

Por otra parte, se han descrito nuevos criterios taxonómicos ultraestructurales (Cavalier-Smith, 1981) y moleculares (Hausmann y Hülsmann, 1996) por lo que la clasificación se podría plantear como se indica a continuación:

Reino	Excavata (Cavalier-Smith, 1981)
	Mastigota (Hausmann y Hülsmann, 1996)
Superfilo	Discicristata (Cavalier-Smith, 1993)
Filo	Euglenozoa (Cavalier-Smith, 1981)
Subfilo	Saccostoma (Cavalier-Smith, 1993)
Clase	Kinetoplastea (Honigberg 1963 stat. nov. Margulis 1974)
Orden	Trypanosomatida (Kent, 1880 stat. nov. Hollande, 1952)

El género *Leishmania* forma un grupo monofilético con tres subgéneros distintos *L. (Leishmania)* *L. (Viannia)* y *L. (Sauroleishmania)* según un estudio en el que se identificaron los polimorfismos en el gen hsp70 (Fraga y col., 2010). No existe un consenso acerca de si el origen del género *Leishmania* spp. fue en el Viejo Mundo o en el Nuevo Mundo. Sin embargo, numerosos estudios filogenéticos apuntan a lo segundo (Lukes y col.,

2007). En Sudamérica, dentro del complejo *L. donovani*, se ha descrito una especie muy similar a *L. infantum*, conocida como *L. chagasi* cuyo origen probablemente sea de la introducción hace aproximadamente quinientos años de *L. infantum* a través de perros infectados durante la colonización por las poblaciones europeas (Fraga y col., 2010).

La clasificación del género *Leishmania* está basada en el patrón isoenzimático por electroforesis de enzimas multilocus (MLEE). En la cuenca mediterránea se han identificado 25 zimodemas, siendo el MON-1 el responsable de la mayoría de casos de VL en esta área (Rioux y col., 1986). Se trata de un zimodema polifilético con hasta 10 genotipos distintos identificados mediante la técnica de amplificación de ADN polimórfico al azar (RAPD) (Hide y col., 2001).

1.2.2. Ciclo biológico de *Leishmania*.

El ciclo biológico de *Leishmania* es dimórfico y digenético, puesto que se alternan dos estadíos en dos hospedadores diferentes. El promastigote es el estadío extracelular móvil fusiforme y con flagelo emergente en la parte anterior del cuerpo celular. Se dividen por fisión binaria longitudinal en el tubo digestivo de hembras de los géneros *Phlebotomus* (Viejo Mundo) y *Lutzomya* (Nuevo Mundo) (Figura 5A) que se encuentra aproximadamente a 27 °C. El amastigote es el estadío intracelular de morfología esférica o cuasi-esférica que infecta a células del sistema fagocítico-mononuclear del hospedador (Handman, 2001).

Los promastigotes que se encuentran en la hipofaringe del flebotomo, producen el denominado gel secretado por promastigotes (PSG), que impide que el vector se alimente de la sangre del hospedador mamífero. Esto obliga al flebotomo a regurgitar e inocular en los capilares cutáneos del mamífero, junto con su saliva, los promastigotes y el PSG antes de poder ingerir sangre (Figura 5B y 5C). A continuación, los promastigotes inoculados son fagocitados por células del sistema fagocítico mononuclear (principalmente por macrófagos), formándose el fagosoma e iniciando la diferenciación al estadío amastigote. El fagosoma se fusiona con lisosomas de la célula hospedadora y se forma el fagolisosoma, donde los amastigotes son capaces de multiplicarse por bipartición hasta colapsar al fagocito infectado. Tras la lisis de la célula hospedadora, los amastigotes liberados son capaces de infectar a otros fagocitos diseminándose por el torrente sanguíneo. Cuando otro flebotomo ingiere sangre del hospedador vertebrado infectado, se forma en el tubo digestivo del vector una membrana constituida principalmente por fibras de quitina, proteínas y glucoproteínas secretadas por las células epiteliales del tubo digestivo del vector, denominada membrana peritrófica, que permite la lisis de los fagocitos y la liberación de los amastigotes protegiéndolos de las enzimas digestivas del flebotomo (Pimenta y col., 1997). Los amastigotes se diferencian en el interior de la membrana peritrófica en promastigotes procíclicos, de morfología ovoide, los cuales secretan quitinasas que permiten su liberación y el inicio de su migración probablemente dirigida por quimiotaxis y osmotaxis a la parte anterior del tubo digestivo del flebotomo (Barros y col., 2006). Durante la migración, los promastigotes aumentan su capacidad infectiva, experimentando un proceso denominado metaciclologénesis, durante el cual el cuerpo celular se estrecha, el flagelo se alarga y se produce un engrosamiento del glicocáliz, que disminuye su adherencia. Finalmente, los promastigotes metacíclicos se acumulan en la hipofaringe para ser inoculados durante la siguiente ingesta del flebotomo, cerrando de este modo el ciclo biológico (Figura 6).

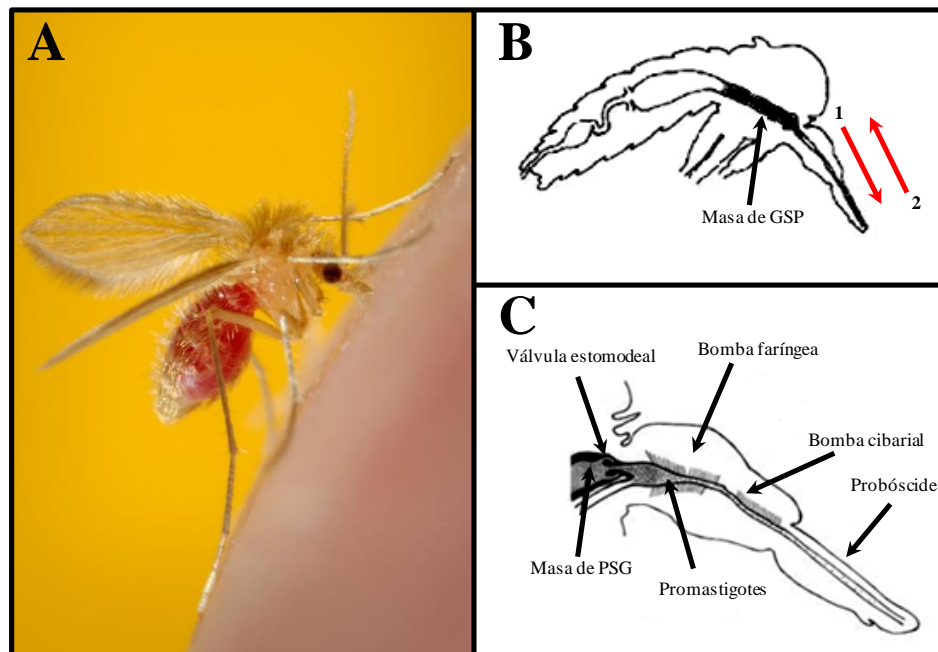


Figura 5. Esquema de la ingesta e inoculación de promastigotes de *Leishmania* spp. por parte del hospedador invertebrado en el hospedador mamífero. (A) Hembra adulta de *Phlebotomus* spp. durante la ingesta de sangre. Imagen obtenida de la Biblioteca de Imágenes de Salud Pública (PHIL) (Centro para el Control y Prevención de Enfermedades, Georgia, Estados Unidos). (B) Corte sagital del tubo digestivo completo de una hembra de flebotomo. La masa de PSG junto con los promastigotes ha de ser expulsada (1), para permitir la ingesta de sangre (2). (C) Detalle del tubo digestivo anterior. Los promastigotes se concentran en el extremo anterior de la masa de PSG. (Adaptado de (Bates, 2007).

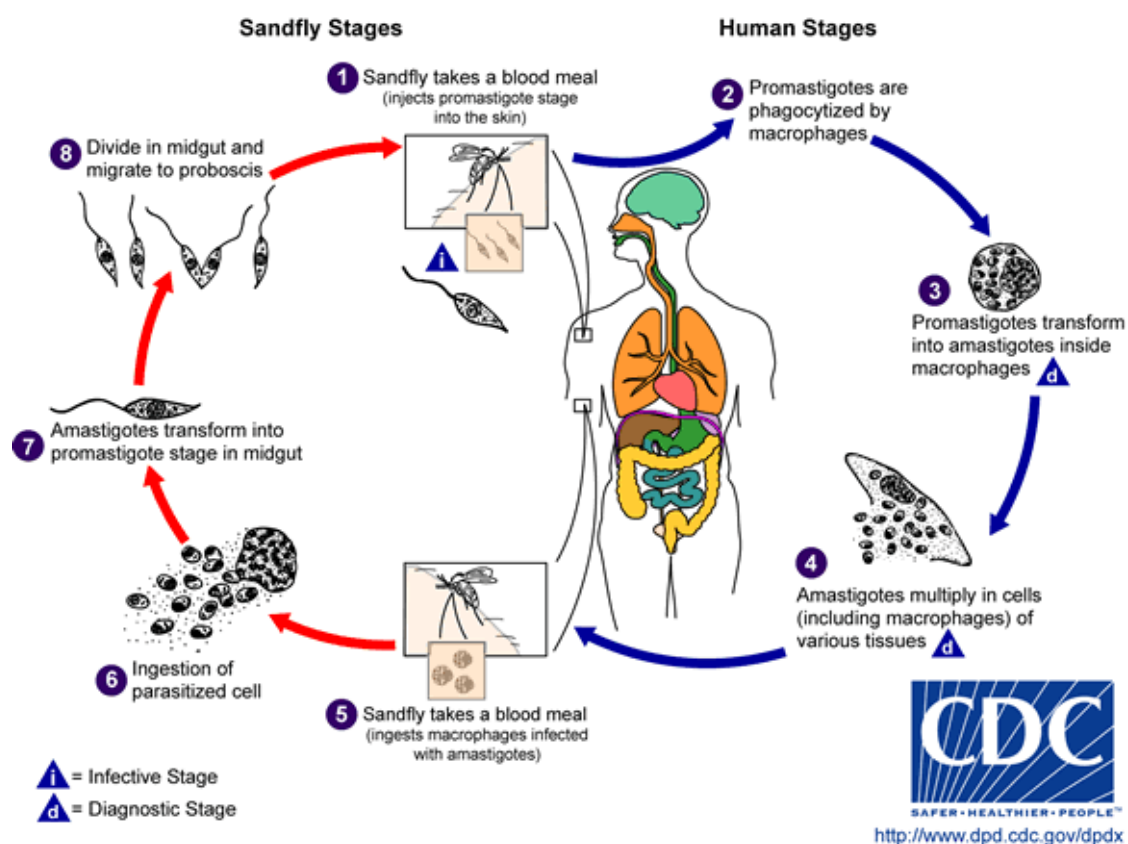


Figura 6. Ciclo biológico de *Leishmania*. Imagen obtenida de PHIL (Centro para el Control y Prevención de Enfermedades, Georgia).

1.2.3. Morfología y ultraestructura de *Leishmania*.

Los promastigotes de *Leishmania* son células con una longitud de 5-20 μm y un flagelo de extensión similar. Por otro lado, los amastigotes son células ovoides con una longitud de 6-8 μm y sin flagelo expuesto. Ambos estadios presentan una morfología polarizada con distintos orgánulos situados en localizaciones subcelulares específicas (Figura 7). En la parte anterior de la célula se encuentra el blefaroplasto de donde emerge el flagelo. En esta zona se producen los procesos de endocitosis y exocitosis. La estabilidad morfológica se mantiene gracias a unos haces de microtúbulos subpeliculares (Hommel, 1978). El túbulo multivesicular (MVT) es un lisosoma específico del género *Leishmania* que se extiende desde la parte anterior hasta la parte posterior del cuerpo celular, que se ha propuesto que podría ser el compartimento terminal de las rutas de endocitosis del promastigote (Waller y McConville, 2002). También existe un conjunto de microtúbulos citoplasmáticos dispuestos a lo largo del MVT que ayudan a mantener la estructura morfológica del orgánulo.

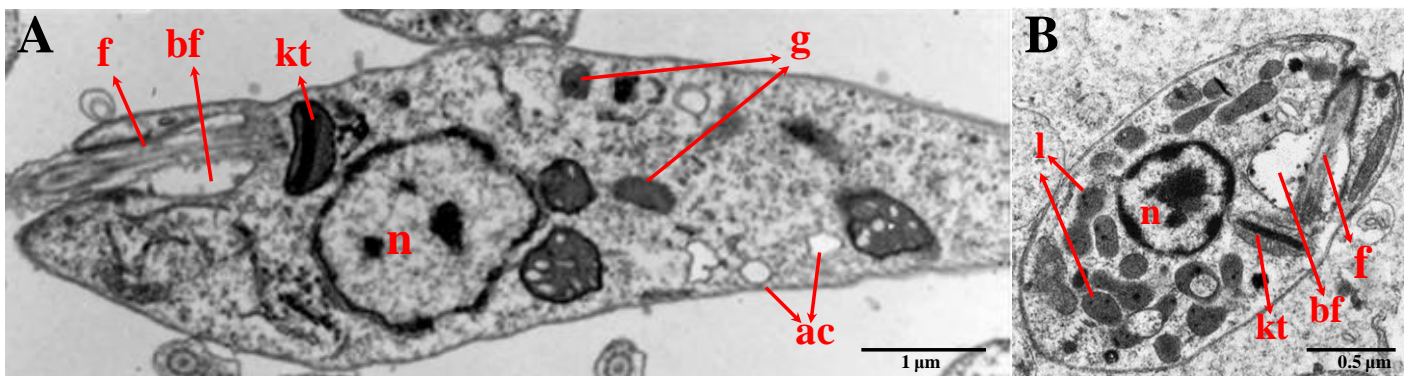


Figura 7. Ultraestructura del promastigote y el amastigote de *Leishmania*. (A) Ultraestructura del promastigote (adaptado de Flashpohler y cols., 1997). (B) Ultraestructura del amastigote (adaptado de Russell y cols., 1992). n, núcleo; kt, kinetoplasto; bf, blefaroplasto; f, flagelo; g, glicosomas; ac, acantosomas; l, lisosomas.

Los tripanosomátidos presentan una única mitocondria, normalmente en la parte anterior de la célula, en la que se encuentra el kinetoplasto, un orgánulo específico de los kinetoplástidos. En su interior existe una red compleja de numerosas moléculas de ADN circular de dos tipos: los maxicírculos, que son moléculas de 20-40 Kpb que codifican para las proteínas necesarias para la mitocondria y los minicírculos, moléculas con un tamaño inferior a 1 Kpb que codifican para las moléculas de ARN guía, el cual participa en los procesos de edición de los genes presentes en los maxicírculos (Brennicke y col., 1999). Otros orgánulos presentes en la célula son el núcleo, el retículo endoplásmico (RE) que, en los promastigotes en división, presenta una extensión en forma de cisterna denominado RE transicional (tRE) y que participa en el transporte vesicular entre el RE y el aparato de Golgi (Mullin y col., 2001), los acantosomas, encargados del almacenamiento de cationes y las moléculas de polifosfato (Moreno y col., 2000, Zhang y col., 2005) y unos orgánulos específicos de los tripanosomátidos similares al peroxisoma denominados glicosomas, en los que se desarrollan numerosos procesos metabólicos de la célula.

La membrana citoplasmática de *Leishmania*, presenta ciertas moléculas específicas de tripanosomátidos. Los fosfolípidos de glicosilinositol (GIPLs) no unidos a proteínas y las moléculas de LPG ancladas a la membrana a través de uniones con glicosilfosfatidilinositol (GPI) junto con proteínas ancladas a la membrana a través de GPI forman un denso glicocálix a lo largo de toda la superficie de los promastigotes, incluyendo el flagelo. Los ligandos

con capacidad de unirse a los macrófagos son glicoconjugados unidos a la membrana citoplasmática a través de GPI. Uno de estos ligandos es la proteína GP63 o leishmanolisina, que tiene la capacidad de unirse a distintos receptores en el macrófago (Brittingham y col., 1999). Por otro lado, el LPG es el componente más abundante del glicocálix y está compuesto por una cadena fosfolipídica a la que se unen a través de enlaces fosfodiéster cadenas laterales con distintos glicanos que varían en función de la especie y del estadio. El LPG es esencial para la transmisión del parásito (Stierhof y col., 1999) y se considera un factor de virulencia en el hospedador vertebrado, tanto en *L. major* (Kelleher y col., 1992) como probablemente en *L. infantum* (Alcolea y col., 2009). Además, es posible que participe en la adhesión en el tubo digestivo del vector (Sacks y col., 2000). Por otra parte, la superficie de los amastigotes presenta una menor abundancia de LPG y en su lugar, hay una gran cantidad de GPI libre y de glicosfingolípidos adquiridos de la membrana de la vacuola parasitófora de la célula hospedadora (McConville y Blackwell, 1991, Turco y Sacks, 1991, Winter y col., 1994, Turco y col., 2001).

1.2.4. El cultivo *in vitro* de promastigotes de *Leishmania*.

El desarrollo de medios de cultivo ha facilitado el avance en el conocimiento de la biología de *Leishmania*. Los medios utilizados para el cultivo de *Leishmania* se pueden clasificar en dos categorías: medios líquidos monofásicos de promastigotes (Neal y Miles, 1963, Lemma y Schiller, 1964, Steiger y Steiger, 1977, Berens y Marr, 1978) y medios semisólidos bifásicos como el medio NNN (Novy y MacNeal, 1904; Nicole, 1908), que actualmente se sigue utilizando para la adaptación de cepas de *Leishmania* aisladas desde el hospedador vertebrado o invertebrado. Los medios de cultivo utilizados habitualmente para el estudio de promastigotes no tienen una composición definida, ya que contienen sangre o suero en una alta proporción (10-30%) que aportan nutrientes importantes para la multiplicación del parásito. Entre ellos se incluyen los medios M199H, RPMI 1640, el medio mínimo *Dulbecco* (Hendricks y col., 1978) y el medio de *Schneider* para *Drosophila*. Sin embargo, la imposibilidad de estandarizar la composición del medio de cultivo complica el estudio de ciertos parámetros biológicos e inmunológicos. Por ello se han desarrollado numerosos estudios para encontrar medios de cultivo adecuados para el crecimiento de promastigotes de *Leishmania* con una composición química definida (Iovannisci y Ullman, 1983, Melo y col., 1985, Kar y col., 1990, Gupta y Saran, 1991, Merlen y col., 1999). Los cultivos axénicos de promastigotes se mantienen a una temperatura de 26-27 °C y a un pH alrededor de 7,2, que son los valores medios existentes en el tubo digestivo del vector (Zilberstein y Shapira, 1994). El tiempo de crecimiento de los promastigotes de *Leishmania* oscila entre 4 y 8 días hasta alcanzar la fase estacionaria, y entonces se subcultivan en medio nuevo.

Mediante experimentos de infección desarrollados en ratones, se pudo comprobar que los promastigotes en cultivo axénico en fase estacionaria seguían teniendo una capacidad infectiva, similar a los promastigotes metacíclicos. Sin embargo, aquellos que se encontraban en la fase logarítmica de crecimiento tenían una menor capacidad infectiva (Sacks y Perkins, 1984). Los cambios morfológicos y bioquímicos observados en los promastigotes metacíclicos aislados del hospedador invertebrado (descrito como metaciclologénesis), se reproducían en los promastigotes aislados del cultivo en fase estacionaria (Sacks y col., 1985, McConville y col., 1992). Las diferencias bioquímicas y estructurales entre las subpoblaciones procíclica y metacíclica aisladas de cultivo axénico permiten su separación mediante distintos procedimientos. Por un lado la diferencia en la composición del LPG

entre ambas subpoblaciones permite la aglutinación selectiva de promastigotes procíclicos en fase estacionaria utilizando la aglutinina de cacahuete (*Arachys hypogaea*) (PNA). Mientras que en los promastigotes procíclicos los glicanos unidos a la cadena de fosfolípidos son residuos de D-galactosa que permiten su aglutinación por la PNA (subpoblación PNA⁺), en los metacíclicos los residuos de D-galactosa se encuentran bloqueados por residuos de D-arabinosa y por tanto no pueden ser aglutinados (subpoblación PNA⁻) (McConville y col., 1992). En el caso de *L. infantum*, la subpoblación PNA⁻ representa en torno al 1% del total de promastigotes en fase estacionaria (Alcolea y cols., 2008). Por otro lado, las diferencias en las características de densidad entre los promastigotes procíclicos y metacíclicos previamente descritas (Castanys y col., 1984, Spath y Beverley, 2001) permiten su separación utilizando un gradiente por densidad con un polisacárido altamente hidrofílico (Yao y col., 2008) como por ejemplo el Percoll[®].

1.2.5. Factores que influyen en la diferenciación a amastigote y cultivo *in vitro* de amastigotes axénicos.

Una vez que los promastigotes son inoculados por el flebotomo en la dermis del hospedador vertebrado durante la ingesta de sangre, algunos de ellos interaccionan con los fagocitos y se internalizan en las vacuolas parasitóforas o fagolisosomas, donde se diferencian a amastigotes intracelulares (Alexander y Russell, 1992). Las condiciones en el interior del tubo digestivo del flebotomo difieren de las que existen en el interior del fagolisosoma. En este último, el ambiente es ácido (pH 4,5-5,5) y la temperatura varía en función de si la infección es cutánea o visceral (aproximadamente 32 ó 37 °C respectivamente) (Antoine y col., 1998). A pesar de estos cambios notables, los promastigotes fagocitados son capaces de diferenciarse rápidamente, siendo éste un proceso altamente regulado que conlleva cambios en la expresión de los genes y las proteínas, y alteraciones morfológicas importantes. En base a distintos análisis de la diferenciación de promastigote a amastigote se ha propuesto la división del proceso en cuatro fases (Barak y col., 2005, Saxena y col., 2007, Rosenzweig y col., 2008): (1) de 0 a 4 horas los promastigotes reciben la señal de diferenciación y se inicia el arresto del ciclo celular en la fase G1; (2) de 5 a 9 horas cese del movimiento y agregación; (3) de 10 a 24 horas cambios morfológicos; (4) entre las 25 y las 120 horas maduración completa a amastigotes. En las dos primeras horas del proceso se han detectado cambios tales como la sobre-expresión del gen A2 específico de amastigotes y el inicio de la liberación del LPG del glicocálix. La mayoría de cambios metabólicos, así como la pérdida del flagelo, se producen durante las fases 3 y 4. Por otro lado, distintos estudios apoyan la teoría de que durante este proceso existe una remodelación del proteoma basado en la degradación de proteínas (Nugent y col., 2004, Walker y col., 2006) y además se ha identificado durante la metaciclogénesis un mecanismo de autofagia en los compartimentos vesiculares denominados autofagosomas (Cull y col., 2014).

Para la obtención de amastigotes axénicos a partir de un cultivo de promastigotes se desarrollaron estudios *in vitro* basados en mimetizar las condiciones que se producen durante el proceso de invasión de la célula hospedadora por parte del parásito. En general, para obtener amastigotes axénicos se cultivan promastigotes de un cultivo en fase logarítmica tardía o estacionaria en un medio de cultivo de promastigotes en el cual se reduce el pH del medio a 4,5-5,5 y se aumenta la temperatura a 37 °C en presencia de CO₂ al 5-7% durante 120 h (Saar y col., 1998, Debrabant y col., 2004). Los amastigotes axénicos obtenidos mediante este procedimiento muestran una morfología similar a la de los amastigotes intracelulares y además expresan ciertas proteínas específicas de

amastigotes como las proteínas de la familia A2. Por otro lado en el glicocáliz de los amastigotes están ausentes muchas de las moléculas de superficie que caracterizan a los promastigotes, entre ellas el LPG (McConville y Ralton, 1997, Mengeling y col., 1997). No obstante, estudios posteriores han demostrado que existen diferencias notables entre amastigotes intracelulares y axénicos especialmente en proteínas del metabolismo (Rochette y col., 2009).

1.2.6. El metabolismo en *Leishmania*.

El estudio del metabolismo en *Leishmania* se ha centrado principalmente en el estadio promastigote ya que es más fácil de cultivar. Sin embargo, la mejora para la obtención de amastigotes axénicos ha permitido comprender mejor las diferencias existentes en el metabolismo entre los distintos estadios en *Leishmania*.

A diferencia de lo que sucede en mamíferos, en *Leishmania* las enzimas de los siete primeros pasos de la glucólisis (desde la glucosa hasta el 3-fosfoglicerato) se encuentran compartimentalizadas en el glicosoma. Estas enzimas son muy diferentes estructuralmente a sus homólogas en mamíferos (Verlinde y col., 2001). En general, la ruta glucolítica se encuentra muy reducida en el estadio amastigote, sin embargo las actividades enzimáticas específicas (AEE) de las enzimas glucolíticas que participan en la gluconeogénesis se encuentran muy elevadas. Además, se ha descrito que la fructosa-1,6-bisfosfatasa es esencial para la proliferación de los amastigotes en los macrófagos de ratón (Naderer y col., 2006). Por otro lado, en *L. donovani* la enzima gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa citosólica (cGAPDH) ha sido relacionada con la visceralización de la enfermedad (Zhang y col., 2013). La isoenzima glicosomal de ésta (gGAPDH), se utiliza como control de expresión en *Leishmania* (Carter y col., 2010, Mandal y col., 2015). La ubicación dual de algunas enzimas permite que se regulen mediante su reubicación desde el glicosoma al citoplasma y viceversa (Roberts y col., 2004, Zarella-Boitz y col., 2004, Banerjee y col., 2005) a través del marcaje de las proteínas con un péptido en su extremo C-terminal, denominado *peroxisomal-targeting-signal* (PTS) (Oppendoes y Szikora, 2006). En cuanto al ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA), aunque se han identificado todas las enzimas, la limitada capacidad de producir energía de los promastigotes de *Leishmania* en condiciones anaeróbicas, hace dudar que ésta ruta metabólica sea completamente activa en dicho estadio. Sin embargo, en amastigotes existe una sobreexpresión de las enzimas del ciclo de Krebs (Rosenzweig y col., 2008). A pesar de que en promastigotes la fuente principal de energía es la glucosa, también existen distintas enzimas necesarias para catabolizar disacáridos y azúcares C5. La ruta de las pentosas fosfato se encuentra distribuida entre los glicosomas y el citosol y se ha demostrado que es importante para la producción de NADPH y para resistir el estrés oxidativo (Maugeri y col., 2003, Veitch y col., 2004).

La utilización de ácidos grasos como fuente de energía en *Leishmania* a partir de la β -oxidación está incrementada en el estadio amastigote frente al promastigote (Rosenzweig y col., 2008) y parece que se lleva a cabo en la mitocondria, ya que se han identificado ciertas tiolasas con péptidos señal mitocondriales (Mazet y col., 2011), y en el glicosoma (Oppendoes y Szikora, 2006). La síntesis de ácidos grasos podría llevarse a cabo por elongasas codificadas en el genoma de *Leishmania* por 12 genes repetidos en tándem. Esto explicaría la existencia de largas cadenas hidrocarbonadas en la porción lipídica del LPG (Ferguson, 1997). En cuanto a los esteroides de membrana, a diferencia de lo que sucede en mamíferos, en *Leishmania* predominan el ergosterol y sus derivados. Su síntesis se produce a partir de las rutas del mevalonato y de los isoprenoides, para posteriormente sintetizar el

ergosterol a partir de una serie de reacciones específicas de *Leishmania*. Por ello, los últimos pasos de esta ruta metabólica son un objetivo principal para el desarrollo de fármacos (de Souza y Rodrigues, 2009).

En *Leishmania* y otros tripanosomátidos, es necesario añadir hemina o protoporfirina IX al medio de cultivo (Chang y col., 1985) y además no se han detectado las tres últimas enzimas de la ruta de síntesis del grupo hemo (Koreny y col., 2010, Alves y col., 2011), por lo que el hierro tiene que ser captado del medio extracelular. Por el momento, se han identificado dos posibles sistemas de captación del grupo hemo. En el primero, el grupo hemo unido a la hemoglobina es captado por un receptor situado en el bolsillo flagelar que lo endocita y posteriormente es liberado en el lisosoma y translocado al citosol por un transportador de tipo ATP *binding cassette* (ABC). El segundo mecanismo consiste en su captación directa como Fe^{3+} insoluble que es reducido por la enzima reductasa férrica (LFR-1) a Fe^{2+} soluble (Flannery y col., 2011), el cual es captado por el transportador del ión ferroso (LIT1). Este sistema de captación de hierro es esencial para la replicación intracelular de los amastigotes y para su virulencia (Miguel y col., 2013, Mittra y col., 2013).

1.2.6.1. El metabolismo de aminoácidos.

Los promastigotes desarrollan gran parte de su ciclo biológico en el tubo digestivo del vector, donde los nutrientes disponibles son principalmente aminoácidos y proteínas obtenidos a partir de la sangre ingerida. En estudios previos, se han identificado reservas de aminoácidos libres utilizados para la obtención de energía (principalmente prolina, treonina y ácido glutámico) para la síntesis de proteínas y con una función importante en la osmorregulación (Vieira y Cabantchik, 1995). Por otro lado, los estadíos específicos de los mamíferos se establecen en un ambiente donde los ácidos grasos y los aminoácidos representan la fuente principal de energía (Naderer y col., 2006, McConville y col., 2007, Rosenzweig y col., 2008). Las distintas especies del género *Leishmania* son en general auxotrofas para los aminoácidos de cadena ramificada (valina, leucina e isoleucina), los aromáticos (fenilalanina, tirosina y triptófano), la lisina y la histidina. La metionina sólo se puede sintetizar a partir de homocisteína, ya que no se han identificado en el genoma de *Leishmania* las enzimas necesarias para la síntesis de este aminoácido. Esta hipótesis se sustenta por el hecho de que se recupera la viabilidad del cultivo de promastigotes al suplementarlo con homocisteína (García-Estrada y col., 2007). La metionina juega un papel fundamental para distintas funciones celulares como por ejemplo la iniciación de la síntesis de proteínas. Además, actúa como agente metilador en forma de S-adenosilmetionina en numerosos procesos incluyendo la biosíntesis de poliaminas (Byers y col., 1991, Agostinelli y col., 2010) que son muy importantes en las fases en las que existe una rápida multiplicación celular (Colotti y Ilari, 2011). Dado el alto coste energético que supone la síntesis de metionina *de novo*, existe un ciclo alternativo para la regeneración de la misma a partir de metiltioadenosina. En otros tripanosomátidos como en *Trypanosoma brucei brucei* o en *Crithidia fasciculata*, se ha descrito que en el último paso de este ciclo de regeneración de la metionina (transaminación desde un aminoácido donador al oxoácido cetometiltiobutirato — KMTB), los sustratos principales aminodonadores son los aminoácidos aromáticos (Berger y col., 1996, Berger y col., 2001). En el género *Leishmania*, los genes codificantes para las enzimas que participan en este ciclo están conservados en su mayoría. Sin embargo, se desconoce la identidad de la enzima que participa en el último paso de la regeneración, aunque se ha propuesto que esta función la lleve a cabo la enzima tirosina aminotransferasa (TAT) (Marciano y col., 2009).

El catabolismo de aminoácidos es una de las fuentes principales de obtención de energía en el estadio amastigote, dada la ausencia de glucosa y otros glúcidos. A pesar de que existen numerosos genes anotados en *Leishmania* que codifican para proteínas que participan en el intercambio del nitrógeno del grupo amino, en la mayoría de los casos se desconoce el destino de la cadena carbonada de los aminoácidos. La prolina es metabolizada a glutamato, que posteriormente es desaminado por una deshidrogenasa y entra en el ciclo de Krebs. Sin embargo, las funciones de este aminoácido son variadas, entre ellas la osmorregulación o su participación en la inmunosupresión (Bringaude y col., 2012). Por otro lado, el aspartato es desaminado por una deshidrogenasa mitocondrial, lo que da lugar al oxalacetato (OAA), que también se incorpora al ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA). Con respecto a la treonina, existen dos rutas metabólicas de oxidación. La primera se inicia con la producción de glicina a partir de treonina, catalizada por la enzima serina hidroximetiltransferasa, y posteriormente, la glicina es convertida en serina en una reacción dependiente de tetrahidrofolato (THF). La serina resultante es desaminada produciendo piruvato, que se incorpora al ciclo TCA (Oppenheimer y Coombs, 2007).

En el género *Leishmania*, los aminoácidos de cadena ramificada (valina, leucina e isoleucina) son una fuente importante de sustratos para el ciclo TCA. El primer paso del catabolismo de estos aminoácidos lo lleva a cabo una aminotransferasa de cadena ramificada con una amplia especificidad de sustrato, la aminotransferasa de cadena ramificada (BCAT) (Vernal y col., 2003). Por otro lado, se ha demostrado que la leucina se incorpora en la ruta del mevalonato para la producción de esteroides (Ginger y col., 2000, Ginger y col., 2001). Por otra parte, la arginina es necesaria para la síntesis de poliaminas y la delección del gen que codifica la enzima glicosomal arginasa impide la viabilidad de los parásitos (Roberts y col., 2004). Esta enzima produce a partir de L-arginina el aminoácido L-ornitina, el cual se descarboxila a putrescina por la ornitina descarboxilasa. En *Leishmania* la arginasa se ha demostrado que podría ser una buena diana terapéutica para el desarrollo de inhibidores (da Silva y col., 2015).

1.2.6.2. El metabolismo de aminoácidos aromáticos.

En 1957, Chatterjee y Ghosh identificaron por primera vez en extractos de *L. donovani* una alta actividad de transaminación de aminoácidos aromáticos (Chatterjee y Ghosh, 1957). Más tarde se caracterizó esta actividad enzimática en otros tripanosomátidos como *C. fasciculata* (Constantzas y col., 1971) y *T.b. gambiense* (Newport y col., 1977). Además se identificó una elevada actividad de TAT en la sangre de roedores infectados con *T. b. gambiense* (Stibbs y Seed, 1976). Los autores relacionaron esta alta tasa de actividad enzimática del parásito con su patogenia debido a la producción de una serie de compuestos aromáticos tóxicos (incluyendo el ácido fenilpirúvico, el ácido *p*-hidroxifenilpirúvico — pHPP — y el indol etanol) (Tizard y col., 1978, Seed y col., 1983, Hall y col., 1985). Más adelante, se describió la transaminación del triptófano a indol-3-lactato como el único producto obtenido de la degradación del triptófano y se descartó la posibilidad de que ésta ruta metabólica pudiera estar contribuyendo a la patogenia de la enfermedad o a la obtención de energía (Leelayoova y col., 1992). A continuación, se demostró en *Trypanosoma cruzi* que existía una alta tasa de excreción en epimastigotes de α -hidroxiácidos aromáticos, incluyendo el ácido *p*-hidroxifenil láctico (pHPL), el ácido fenil láctico y el ácido 3-indol láctico, sin embargo dicha excreción no se observó en *L. mexicana* (Montemartini y col., 1994a). Todos ellos son los productos finales de la degradación de los aminoácidos aromáticos. Sin embargo, en un estudio reciente se ha

detectado la excreción de los productos resultantes del catabolismo de los aminoácidos aromáticos en promastigotes de *L. donovani*, *L. major* y *L. mexicana* (Westrop y col., 2015).

En *T. cruzi* la ruta catabólica de los aminoácidos aromáticos consiste en dos pasos secuenciales. En el primero se produce la transaminación del grupo amino del aminoácido aromático a un α -oxoácido aceptor y esta reacción está catalizada por una enzima con actividad TAT. En el segundo paso el producto desaminado previamente es reducido en una reacción NAD(P)H dependiente por una hidroxilácido deshidrogenasa específica del isómero L (L-HADH) produciendo de este modo un L-hidroxilácido que es posteriormente excretado. Aunque no existe anotada en el genoma de *L. infantum*, una hidroxilácido deshidrogenasa específica del isómero L, sí existe una específica del isómero D (LinJ.34.4360) que se ha sugerido como la enzima responsable de la deshidrogenación del pHPP en pHPL (Alcolea y col., 2009). En otro estudio, se describió que existía sobreexpresión del gen codificante para la TAT de *T. cruzi* (TcTAT) en cepas resistentes al estrés oxidativo producido por benznidazol. Sin embargo dicha sobre-expresión no se correspondía con un aumento en la expresión de la proteína (Rego y col., 2008).

Por otro lado, el gen que codifica la enzima TAT de *L. infantum* (LiTAT), se ha identificado como sobre-expresado en la subpoblación de promastigotes PNA⁻, con una mayor capacidad infectiva lo que ha llevado proponer la relación entre el producto de este gen y la infectividad del parásito (Alcolea y col., 2009).

1.3. La tirosina aminotransferasa.

Las aminotransferasas catalizan la transaminación de un grupo amino desde la molécula donadora, que es normalmente un aminoácido, a un aceptor que suele ser un α -oxoácido. Los productos obtenidos son el aminoácido resultante de la aminación del oxoácido aceptor y el oxoácido obtenido a partir de la desaminación del aminoácido (Figura 8). En concreto la tirosina aminotransferasa (TAT) cataliza la transaminación del grupo amino de la tirosina y de otros aminoácidos aromáticos a distintos α -oxoácidos que varían en función de la especificidad de la enzima.

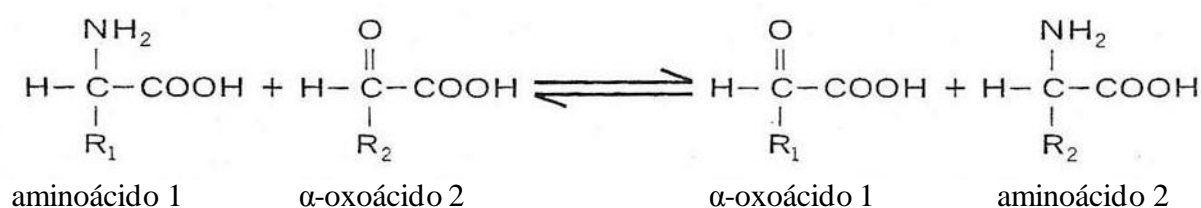


Figura 8. Esquema general de transaminación.

1.3.1. Clasificación de las aminotransferasas.

Las división de enzimas dependientes de piridoxal fosfato (PLP) constituyen una de las superfamilias más grandes y con una distribución ubicua. Incluyen numerosos tipos de actividades enzimáticas agrupadas en función del número asignado por la comisión enzimática (*EC number*) de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (IUBMB). Se distinguen cinco plegamientos estructurales principales (Grishin y col., 1995) que posiblemente pertenezcan a cinco linajes evolutivos distintos (Mehta y Christen, 2000, Christen y Mehta, 2001). Las enzimas pertenecientes a ésta división, implicadas en la transaminación de compuestos con grupos amino forman la superfamilia de las aminotransferasas. Dentro del plegamiento tipo I (proteínas con estructura de tipo

α/β) se encuentran cuatro de las cinco clases de aminotransferasas (Tabla 1). Las aminotransferasas de clase IV se sitúan dentro del plegamiento de tipo IV (entre ellas las aminotransferasas específicas del isómero D).

Tabla 1. Enzimas dependientes de PLP (adaptado de (Grishin y col., 1995).

Plegamiento tipo I	Nombre	Número EC	Gen en <i>L. infantum</i>
Aminotransferasas clase I	Aspartato aminotransferasas	EC 2.6.1.1.	LinJ.24.0370 LinJ.35.0840
	Tirosina aminotransferasas	EC 2.6.1.5.	LinJ.36.2490
	Aminotransferasas aromáticas	EC 2.6.1.57.	-
	Alanina aminotransferasas	EC 2.6.1.2.	LinJ.12.0580
	1-aminociclopropano-1-carboxilato-sintasas	EC 4.4.1.14.	-
Aminotransferasas clase II	Glicina acetiltransferasas	EC 2.3.1.29.	-
	5-aminolevulínico sintasas	EC 2.3.1.37.	-
	8-amino-7-oxonanoato sintasas	EC 2.3.1.47.	-
	Histidinol-fosfato aminotransferasas	EC 2.6.1.9.	-
	Serina palmitoiltransferasas	EC 2.3.1.50.	LinJ.34.3530 LinJ.35.0320
Aminotransferasas clase III	Acetilornitina aminotransferasas	EC 2.6.1.11.	-
	Ornitina aminotransferasas	EC 2.6.1.13.	-
	ω -aminoácido-piruvato aminotransferasas	EC 2.6.1.18.	-
	4-aminobutirato aminotransferasas	EC 2.6.1.19.	-
	Ácido 7,8-diaminopelargonico transferasas	EC 2.6.1.62.	-
	2,2, dialquilglicina decarboxilasas	EC 4.1.1.64.	-
	Glutamato 1-semialdehído aminotransferasas	EC 5.4.3.8.	-
	Lisina Σ -aminotransferasas	EC 2.6.1.36.	-
Aminotransferasas clase V	Fosfoserina aminotransferasas	EC 2.6.1.52.	-
	Serina-piruvato aminotransferasas	EC 2.6.1.51.	-
Otras	Serina hidroximetiltransferasas	EC 2.1.2.1.	LinJ.28.2530
	Tirosina fenol-liasas	EC 4.1.99.2.	-
	Glutamato descarboxilasas	EC 4.1.1.15.	-
	Histidina descarboxilasas	EC 4.1.1.22.	-
	L-aminoácido aromático descarboxilasas	EC 4.1.1.28.	-
	Cistationa γ -liasas	EC 4.4.1.1.	LinJ.35.3280
	Cistationa γ -sintasas	EC 4.2.99.9.	-
	Cistationa β -liasas	EC 4.4.1.8.	LinJ.14.0470
	Glicina descarboxilasas	EC 1.4.4.2.	LinJ.26.0040

Todas las aminotransferasas presentan una estructura similar relacionada con la disposición del cofactor. Más específicamente, la clase I se subdivide en siete subclases ($I\alpha$, $I\lambda$, $I\beta$, $I\Omega$, $I\delta$, $I\gamma$ and $I\phi$) (Jensen y Gu, 1996). La subclase $I\alpha$ es la que se ha estudiado en mayor profundidad y entre sus funciones bioquímicas se encuentra la interconversión de aspartato y oxaloacetato (OAA) llevada a cabo por las aspartato aminotransferasas (Kuramitsu y col., 1985, Kamitori y col., 1990). En el genoma de *L. infantum* existen dos genes anotados como aspartato

aminotransferasa en GeneDB, pero hasta el momento no han sido caracterizados en profundidad. Dentro de la subfamilia I γ se encuentran las tirosina aminotransferasas con capacidad de transaminar aminoácidos aromáticos.

En los tripanosomátidos existen distintos genes condificantes anotados como aminotransferasas en base a su homología de secuencia con otras aminotransferasas previamente caracterizadas. La mayoría son aspartato aminotransferasas (subfamilia I α -ASAT), alanina aminotransferasas (subfamilia I δ -ALAT) y aminotransferasas aromáticas, entre ellas las tirosina aminotransferasas (subfamilia -ARAT y TAT) (Figura 9).

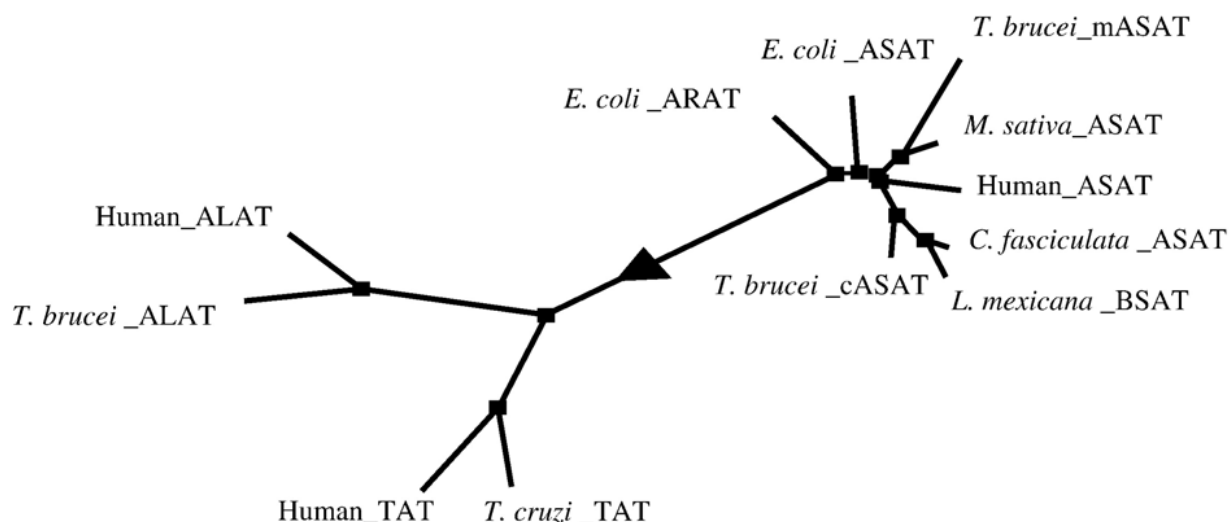


Figura 9. Cladograma representativo de aminotransferasas de clase I humanas y de tripanosomátidos. (Nowicki y Cazzulo, 2008).

1.3.2. Mecanismo de acción de la tirosina aminotransferasa.

El mecanismo general de transaminación fue propuesto por primera vez para la aspartato aminotransferasa mitocondrial (Kirsch y col., 1984). Todo el mecanismo de acción se lleva a cabo en el centro activo del enzima en donde se encuentra la coenzima, el piridoxal fosfato (PLP) el cual está unido a una lisina formando una base de *Schiff* (Figura 10). Cuando la tirosina entra en el centro activo, la amina primaria de ésta reacciona actuando como nucleófilo sobre el carbono 1 en posición α y generando un intermediario no estable en forma de aldimina externa con un centro quiral. A continuación, una base (posiblemente la lisina unida previamente a la coenzima) desprotona el centro quiral de la aldimina externa generando distintas formas resonantes, entre ellas la forma quinonoide. Ésta forma resonante facilita el ataque nucleofílico del oxígeno de una molécula de agua adyacente y permite la liberación de la enzima y de la coenzima la cual se encuentra estabilizada de forma libre como piridoxamina fosfato (PMP) en el interior del centro activo. Como producto se libera el α -oxoácido derivado del aminoácido, que en el caso de la tirosina es el pHPP. En el segundo paso de la reacción, el grupo carbonilo del α -oxoácido aceptor recibe el ataque nucleofílico de la amina primaria del estado de transición PMP, formándose un aducto con un nuevo centro quiral. Finalmente, el nuevo aminoácido generado es liberado gracias a que una molécula de agua capta el hidrógeno del centro quiral, permitiendo el ataque nucleofílico de la amina secundaria de la lisina, sobre la imina formada, regenerando de este modo el PLP (Figura 10).

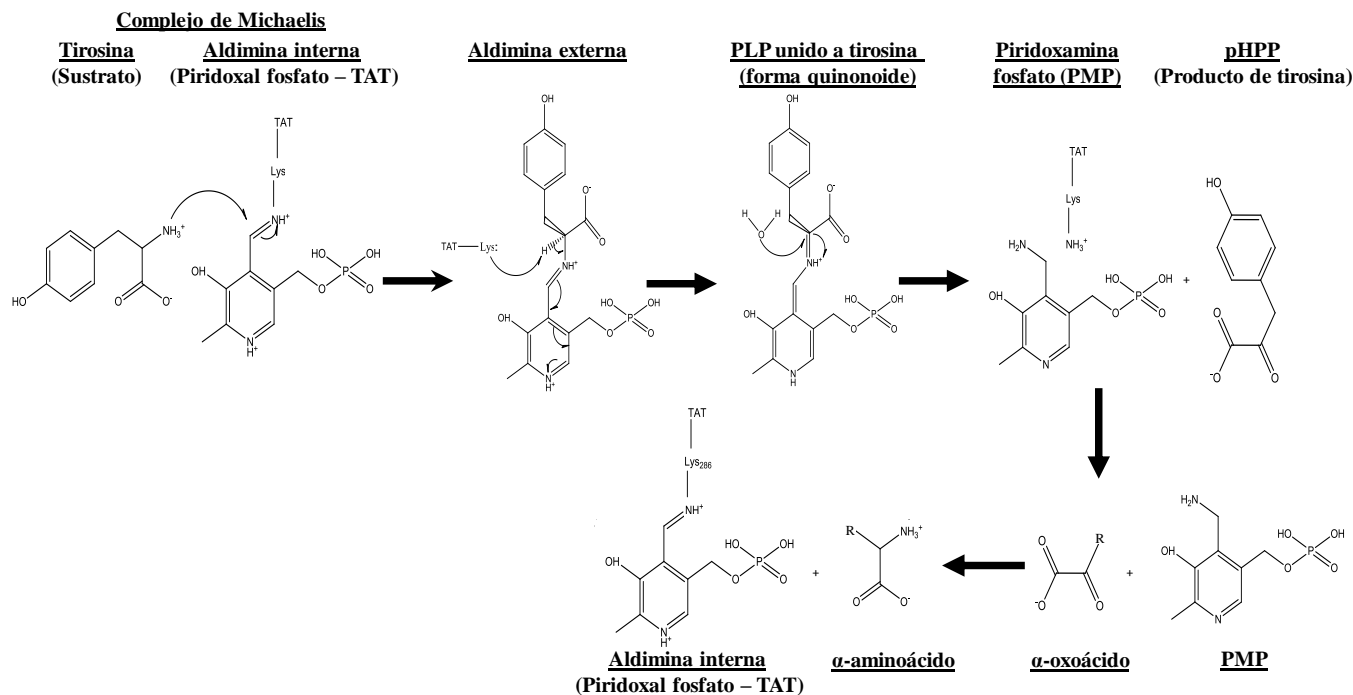


Figura 10. Esquema de la reacción de transaminación de la tirosina por la enzima TAT.

La resolución de la estructura tridimensional por cristalografía de rayos X de la proteína TAT de *T. cruzi*, ha permitido identificar los residuos que participan en el reconocimiento de los sustratos aminodonadores y que estabilizan a la coenzima, y comprender el mecanismo de acción en la transaminación de los aminoácidos aromáticos catalizado por esta enzima (Blankenfeldt y col., 1999, Sobrado y col., 2003). La especificidad de ésta enzima frente a los α -oxoácidos aceptores del grupo amino es más amplia que la de la TAT humana de hígado, sin embargo la disposición espacial de la coenzima es similar (Mehere y cols., 2010). La TAT de mamíferos reacciona de forma específica con α -cetoglutarato (actividad ALAT) y preferiblemente con aminoácidos aromáticos, siendo la pareja de sustratos preferida α -cetoglutarato/tirosina (Sivaraman y Kirsch, 2006). Por el contrario, TcTAT puede reaccionar con α -cetoglutarato, piruvato y oxalacetato (Montemartini y col., 1993, Montemartini y col., 1995). En un trabajo posterior, se identificaron a dos de los residuos responsables del reconocimiento de los oxoácidos dicarboxílicos, los cuales se encuentran en el dominio N-terminal (Sobrado y col., 2003). Estos residuos se encuentran conservados en mamíferos, lo que explicaría que ambas enzimas sean capaces de transaminar oxoácidos dicarboxílicos.

Dadas las diferencias estructurales con el ortólogo en mamíferos, y su importancia en el metabolismo de los tripanosomátidos, se ha considerado que la enzima TAT podría ser una buena diana terapéutica. Todo esto hace interesante el estudio de la proteína TAT en *Leishmania* con el objetivo de diseñar racionalmente inhibidores de su actividad.

Teniendo en cuenta esto, y que además existe una sobre-expresión del gen que codifica para LiTAT en la subpoblación de promastigotes PNA⁻, se ha llevado a cabo el estudio en profundidad de esta proteína y de su participación en el ciclo biológico de *L. infantum*.

2

Objetivos

La posible implicación del gen de la tirosina aminotransferasa en los procesos de infectividad de *L. infantum* ha llevado al objetivo general del presente estudio, que es la caracterización de la enzima codificada por dicho gen y el análisis de su función en el metabolismo del parásito. Se han definido los siguientes objetivos específicos para el desarrollo del mismo:

1. Análisis de la secuencia del gen de LiTAT, y expresión y purificación de la proteína codificada por dicho gen.
2. Expresión y regulación de LiTAT en el ciclo biológico de *L. infantum*.
3. Localización subcelular de LiTAT.
4. Estudio de la ruta metabólica en la que participa la tirosina aminotransferasa de *L. infantum*.
5. Resolución de la estructura tridimensional de LiTAT.
6. Evaluación del nivel de protección inducido por LiTAT frente a la infección experimental con *L. infantum* en el modelo de ratón.

3

Material

y

métodos

3.1. Material biológico.

3.1.1. Bacterias.

Se utilizó la cepa de *Escherichia coli* DH5 α , con genotipo F⁻ Φ 80 lacZ Δ M15 Δ (lacZYA⁻argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (r_k⁻, m_k⁺) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ ⁻ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Estados Unidos) para el clonaje de genes de *Leishmania* spp. en los vectores plasmídicos pRSET-A y pAVA.

La estirpe de *E. coli* BL21 (DE3) pLysS, con genotipo F⁻ omp T hsdSB (rB⁻, mB⁻) gal dcm (DE3) pLysS (Cam^R) (Thermo Fisher Scientific) fue empleada para la expresión de los genes de interés y la purificación de proteínas recombinantes, excepto para la malato deshidrogenasa citosólica (cMDH) de *L. infantum* para cuya expresión se utilizó la cepa BL21 (DE3) pLysS RosettaTM 2, con genotipo F⁻ ompT hsdSB (rB⁻ mB⁻) gal dcm (DE3) pLysS RARE2 (Cam^R) (Merck Millipore, Billerica, Estados Unidos).

3.1.2. Parásitos.

Durante el desarrollo de este estudio, se utilizó el aislado de *L. infantum*, M/CAN/ES/98/10445 (zimodema MON-1) y la cepa de *L. donovani* Karthoum 1246 MHOM/SD/43/124 (Domínguez y Toraño., 2001), ambas proporcionadas por los Dres. Alfredo Toraño y Mercedes Domínguez (Servicio de Inmunología, Centro Nacional de Microbiología, ISCIII, Majadahonda). Además se utilizó un aislado de *L. chagasi* sensible (LBM/LVC/SE/19) y otro resistente (LBM/LVC/SE/30) al NO que fueron cedidos por el Profesor Roque P. Almeida (Universidade Federal de Sergipe, Brasil) (Giudice y col., 2007).

3.1.3. Línea celular humana.

Para la obtención de amastigotes intracelulares de *L. infantum*, se utilizaron células transformadas de la línea celular humana U-937, que se encuentra en un estado de diferenciación pluripotencial mielomonocítico y deriva de efusiones pleurales de un paciente con linfoma histiocítico (Sundstrom y Nilsson, 1976). Esta línea celular se compró en el Servicio de Cultivos Celulares del Centro de Investigaciones Biológicas (Madrid, España).

3.1.4. Modelo experimental de ratón.

Para los ensayos de inmunización e infección experimental para evaluar la respuesta protectora de la inoculación de LiTAT, se utilizaron ratones de la cepa BALB/c sensibles a la infección por *L. infantum*. En el ensayo se utilizaron cuatro ratones por cada grupo y se mantuvieron en el animalario del Instituto de Medicina Tropical y Salud Internacional de La Laguna (Santa Cruz de Tenerife, España) de acuerdo a la normativa de la Unión Europea (Directiva 2010/63/EU).

3.2. Cultivos celulares.

3.2.1. Cultivos bacterianos.

Las bacterias de la estirpe DH5 α de *E. coli* transformadas con los vectores plasmídicos con el gen de selección *bla*^R se seleccionaron en medio sólido LB-agar con ampicilina a 100 μ g/ml. Las estirpes de *E. coli* BL21(DE3) pLysS y BL21 (DE3) pLysS RosettaTM 2 transformadas con los plásmidos pRSET-A o pAVA se seleccionaron en medio sólido LB-agar con ampicilina y cloranfenicol. La resistencia a cloranfenicol es conferida por el gen de

selección *Cam^R* incluido en el plásmido pLysS. Las bacterias se cultivaron a 37 °C durante 16 horas en medio LB (triptona peptona 10 g/l, extracto de levadura 5 g/l, NaCl 10 g/l) en suspensión y con agitación orbital a 200 rpm en presencia de ampicilina 100 µg/ml y cloranfenicol 35 µg/ml. Para la conservación de las bacterias, se utilizó LB con glicerol al 20% y se almacenaron a -80 °C.

3.2.2. Preparación y transformación de bacterias competentes.

Se prepararon células quimiocompetentes de las estirpes BL21 (DE3) pLysS y BL21 (DE3) pLysS Rosetta™ 2 según un procedimiento descrito previamente (Hanahan, 1983). Las células se cultivaron a 37 °C durante 16 horas en medio Φ (triptona peptona 20 g/l, extracto de levadura 5 g/l, NaCl 0,6 g/l, KCl 0,37 g/l a pH 7,6) hasta 0,5 UDO_{600nm}. Posteriormente el cultivo se enfrió a 4 °C durante 15 min y se centrifugó a 1.500 g durante 10 min a 4 °C. El sedimento se resuspendió en solución Tfb I (RuCl₂ 100 mM, MnCl₂ 50 mM, acetato potásico 30 mM, CaCl₂ 10 mM, glicerol 15% a pH 5,8) a 4 °C y se centrifugaron nuevamente. Finalmente, las células se resuspendieron en solución Tfb II (RuCl₂ 10 mM, CaCl₂ 75 mM, MOPS 10 mM, glicerol 15% a pH 6,8) a 4 °C, se congelaron inmediatamente en nieve carbónica en alícuotas de 100 µl y se conservaron a -80 °C. Para la transformación de las bacterias por choque térmico se siguió el protocolo previamente descrito (Sambrook y col., 1989) incubando las células competentes con el ADN durante 45 segundos a 42 °C y posteriormente 2 min a 4 °C.

La preparación de células electrocompetentes se llevo a cabo siguiendo el procedimiento que se detalla a continuación. Se incubó un cultivo de 500 ml de células *E. coli* de la estirpe DH5α en medio LB hasta que se alcanzó entre 0,5 y 0,7 UDO_{600nm}. A continuación se enfrió el cultivo a 4 °C durante 20 min y se centrifugó a 4.000 g y 4 °C durante 20 min. El sedimento se lavó con volúmenes decrecientes (200, 100 y 20 ml) de glicerol al 10% en agua *milliQ* a 4 °C. Finalmente, las células se resuspendieron en 1 ml de glicerol al 10% en agua *milliQ* y se almacenaron en alícuotas de 70 µl a -80 °C. Para realizar la transformación se añadieron 5 µl del producto de ligación (ADN), a cada alícuota de células electrocompetentes previamente dializado durante 30 min frente a agua *milliQ* utilizando membranas de diálisis (Merck Millipore) y se incubó la mezcla durante 5 min en hielo. La mezcla enfriada se transfirió a una cubeta de electroporación de 2 mm de distancia entre electrodos y se aplicó un pulso de entre 1,7 y 2,0 kV durante 4,8-5 ms en un electroporador *MicroPulser* (BioRad, Berkeley, Estados Unidos). Inmediatamente se añadió a la mezcla 1 ml de medio SOC y se incubó durante 1 h a 37 °C. Finalmente, la mezcla se sembró en placas de LB-agar con ampicilina 50 µg/ml.

3.2.3. Cultivo de *Leishmania* spp.

Los cultivos de *Leishmania* spp. se realizaron en un laboratorio de nivel de bioseguridad 2.

3.2.3.1. Cultivo de promastigotes y amastigotes axénicos.

Los promastigotes de *Leishmania* spp. se cultivaron en frascos *Roux* a 27 °C en medio completo constituido por medio Gibco® RPMI 1640 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Estados Unidos) suplementado con un 10% de suero bovino fetal (Sigma-Aldrich, St. Louis, Estados Unidos), inactivado a 56 °C durante una hora (SBF), y con los antibióticos penicilina 100 UI/ml y estreptomycin 100 µg/ml (Thermo Fisher Scientific). En determinados experimentos fue necesario modificar el medio de cultivo para el establecimiento de ciertas condiciones

experimentales. Para el análisis de la dependencia de los nutrientes presentes en el medio de cultivo de *L. infantum*, se utilizó medio RPMI sin SBF con una concentración definida para cada uno de los nutrientes (Merlen y col., 1999). Los cultivos se iniciaron a una densidad celular de 2×10^6 células/ml, y se monitorizó su crecimiento realizando recuentos cada 24 horas con cámaras de *Neubauer* (Brand GMBH, Wertheim, Alemania). Las células fueron sedimentadas a 2.000 g durante 10 min.

Los promastigotes se almacenaron por congelación en SBF con 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich) en nitrógeno líquido a una densidad de 10^8 células/ml. Para conseguir que el descenso de la temperatura fuese gradual ($-1^\circ\text{C}/\text{min}$) se utilizó una cámara *Cryo 1 °C Freezing Container* (Nalgene, Nueva York, Estados Unidos) siguiendo las instrucciones del fabricante.

La línea de amastigotes axénicos se obtuvo según un procedimiento basado en el aumento de la temperatura a 37°C y el descenso del pH a 4,5 en un atmósfera del 5% de CO_2 (Saar y col., 1998, Debrabant y col., 2004). La morfología de los amastigotes axénicos se comprobó en un microscopio óptico (Leica, Wetzlar, Alemania).

3.2.3.2. Obtención de amastigotes intracelulares e infección *in vitro*.

El cultivo de la línea celular U-937 se realizó en un laboratorio de nivel de bioseguridad 2. Las células sin diferenciar se cultivaron en frascos Roux en suspensión en medio completo a 37°C y atmósfera de 5% de CO_2 . Se centrifugaron las células a 250g durante 10 min y su conservación se realizó tal y como se detalla en la sección 3.2.3.1., pero a una densidad celular de 1×10^7 células/ml.

Las células U937, a una densidad celular de $10^6/\text{ml}$, se diferenciaron con forbol-12-miristato-13-acetato (PMA) a una concentración de 20 ng/ml en medio completo fresco. La mezcla se incubó a 37°C y en una atmósfera de 5% CO_2 durante 72 horas.

Tras la diferenciación, se lavó el cultivo con RPMI 1640 por agitación suave para desechar las células no adheridas. Seguidamente se añadieron promastigotes de *L. infantum* en fase estacionaria a una densidad de 2×10^7 promastigotes/ml en medio completo. La mezcla de promastigotes con el cultivo de macrófagos en una relación final de 20×10^6 promastigotes/ 10^6 macrófagos/ml (20:1), se incubó durante 6 h a 37°C en una atmósfera de 5% de CO_2 . Posteriormente, se eliminó el sobrenadante y se hicieron lavados repetidamente con medio RPMI 1640 hasta comprobar, por microscopio óptico (Leica, Wetzlar, Alemania), que se habían desechado los promastigotes libres. A continuación la mezcla de células se incubó a 37°C y 5% de CO_2 durante 48 h en medio completo fresco en un volumen del cultivo inicial. Dada la capacidad de adherencia de las células diferenciadas, éstas se recuperaron mecánicamente utilizando un raspador y se resuspendieron en medio completo recuperándose por centrifugación a 250 g.

3.2.3.3. Obtención de promastigotes con mayor infectividad a partir de cultivos axénicos.

La obtención de promastigotes metacíclicos se realizó mediante dos procedimientos descritos previamente. El primer procedimiento consiste en la aglutinación de promastigotes con PNA (Sigma-Aldrich) lo que permite diferenciar los promastigotes metacíclicos PNA^- y con mayor capacidad infectiva, de los procíclicos PNA^+ (Sacks y cols., 1985; Alcolea y cols., 2009). El método se basa en la separación de ambas subpoblaciones por centrifugación diferencial. Los promastigotes en fase estacionaria se incubaron en medio completo a una densidad celular de $2 \times$

10^8 células/ml con 50 $\mu\text{g/ml}$ de PNA. A continuación, se centrifugaron a 200 g para separar los PNA^- , que permanecen en suspensión en el sobrenadante, de los aglutinantes (PNA^+) que van al sedimento (Spath y Beverley, 2001). La separación de ambas subpoblaciones se comprobó por observación al microscopio óptico. El segundo método utilizado para obtener promastigotes con mayor capacidad infectiva se basa en la separación en función de la densidad en gradiente de Percoll[®] siguiendo un procedimiento previamente descrito (Castanys y col., 1984, Spath y Beverley, 2001).

3.2.3.4. Transfección de promastigotes de *L. infantum* para la generación de líneas celulares *knock-in*.

Para la obtención de promastigotes con capacidad de sobreexpresar genes de interés, se siguió un procedimiento previamente descrito (Alzate y col., 2006) en la Universidad de Alcalá de Henares bajo la dirección del profesor Antonio Jiménez y con las modificaciones que se indican a continuación.

Los genes de interés amplificados por PCR, utilizando los oligonucleótidos indicados en la tabla 2 y tal y como se describe en el apartado 3.3.3.1., se clonaron en el plásmido pJET1.2 incluido en el kit *CloneJET PCR Cloning Kit* siguiendo las indicaciones del fabricante (Thermo Fisher Scientific). A continuación, los insertos fueron subclonados, tras la digestión con la enzima de restricción BglII, según las indicaciones de la casa comercial (New England Biolabs, Ipswich, Estados Unidos) en el plásmido integrativo pIRmcs3 (-) (Hoyer y col., 2004). Las construcciones con ambos genes fueron linealizadas por digestión con la enzima Swa I (Thermo Fisher Scientific). A continuación, se añadió una cantidad conveniente del plásmido linealizado (entre 1,5 y 3 μg de ADN), con o sin inserto, a la cubeta con los promastigotes en el tampón de electroporación y se aplicó un pulso en un electroporador *Electro Cell Manipulator 600* (BTX, Holliston, Estados Unidos). Las condiciones de electroporación fueron las siguientes: 1,5 kV y 24 Ω durante $\sim 0,28$ ms (modo *High voltage*). Con las mismas condiciones se realizó un control negativo de transfección.

Los promastigotes de *L. infantum*, fueron recogidos en fase logarítmica media. Éstos fueron lavados en tampón de electroporación (132 mM NaCl, 8 mM KCl, 8 mM Na_2HPO_4 , 1,5 mM KH_2PO_4 , 0,5 mM de acetato de magnesio, ajustado a pH 7,0 con ácido acético) esterilizado por filtración (0,22 μm). Seguidamente, se lavaron las células y se resuspendieron en el mismo tampón a una concentración de 7×10^8 células/ml y se transfirieron 400 μl de esta mezcla a una cubeta de electroporación con una distancia entre electrodos de 0,2 cm (BTX).

Durante las primeras 24 h, tras el pulso de corriente eléctrica, se cultivaron los promastigotes en medio Gibco[®] RPMI 1640 suplementado con 20% de SBF y sin antibióticos. Transcurrido este tiempo, los promastigotes se subcultivaron en medio completo, constituido por medio Gibco[®] RPMI 1640, suplementado con 20% de SBF y 10% de un sobrenadante de cultivo de promastigotes de *L. infantum* en fase estacionaria esterilizado por filtración (0,22 μm), y con los antibióticos penicilina 100 UI/ml, estreptomycin 100 $\mu\text{g/ml}$ y nourseotricina (Jena Bioscience, Jena, Alemania) como agente de selección a una concentración inicial de 80 $\mu\text{g/ml}$ que se incrementó a 100 $\mu\text{g/ml}$ a los cinco días y a 120 $\mu\text{g/ml}$ a los 10 días, para realizar la selección adecuadamente. Para conocer la concentración inicial de nourseotricina para seleccionar los promastigotes transfectados con el vector, se incubaron los promastigotes del aislado M/CAN/ES/98/10445 de *L. infantum* con distintas concentraciones del antibiótico (12,5, 25, 50, 100 y 200 $\mu\text{g/ml}$) en placas multipocillo de 96 durante 72 h a 27 °C. Tras la incubación, se añadieron 5 $\mu\text{g/ml}$ de yoduro de propidio en cada pocillo y se analizaron inmediatamente el número de parásitos vivos en un

citómetro de flujo FACScalibur (BD Biosciences, San Jose, Estados Unidos). La construcción de la curva dosis-respuesta permitió calcular la dosis letal 50 (DL50) (Anexo III).

3.3. Detección de *p*-hidroxifenil lactato en el sobrenadante de un cultivo de *L. infantum*.

El procedimiento de extracción se llevó a cabo siguiendo un protocolo previamente descrito (Montemertini y col., 1993) con algunas modificaciones. A partir de un cultivo de promastigotes en fase estacionaria de 230 ml mediante centrifugación a 1.500 g se desecharon los promastigotes y posteriormente se filtró el sobrenadante obtenido (0,22 µm). Éste se congeló a -80 °C y se liofilizó durante dos días a -50 °C. El producto liofilizado se resuspendió en 0,05 volúmenes de agua *milliQ*. La solución obtenida se acidificó con H₂SO₄ hasta pH 1,0 y las proteínas precipitadas se eliminaron por centrifugación y posterior filtración (0,45 µm). A partir de la solución acuosa obtenida en el paso anterior, se realizó una extracción líquido/líquido de la fracción orgánica. Para ello, dicha solución se mezcló por agitación vigorosa con 0,5 volúmenes de éter dietílico (Panreac-AppliChem, Darmstadt, Alemania). La fase orgánica resultante, en la parte superior de la mezcla bifásica, se conservó a TA y la fase acuosa, en la parte inferior, se recuperó. Sobre ésta última se realizaron otras dos extracciones más de la fase orgánica con éter dietílico. Todas las fases orgánicas obtenidas se mezclaron y se desecó la mezcla durante 20 min en un rotavapor R-200 (Büchi, New Castle, Estados Unidos). Los cristales obtenidos se solubilizaron en 1 ml de agua *milliQ* y se analizaron por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS).

Para el análisis de la fase orgánica del sobrenadante del cultivo de promastigotes de *L. infantum* en fase estacionaria, se utilizó un sistema HPLC Agilent 1200 a 280 nm (Agilent, Santa Clara, Estados Unidos) equipado con una columna C18 de 5 µm de grosor de fase estacionaria y unas dimensiones de 25 x 0,45 cm. El producto comercial pHPL (Sigma-Aldrich) fue usado como estándar. Como control negativo se utilizó la fase orgánica aislada del medio completo estéril. La muestra resultante del proceso de extracción de la fase orgánica (apartado 3.2.3.5.) fue diluida cinco veces en agua *milliQ* y se almacenó a 4 °C. La elución se llevó a cabo utilizando un gradiente discontinuo de agua/acetonitrilo (ACN), siendo el flujo de 1 ml/min: 10-30% ACN en 6 min, 30% ACN 6-12 min, 30-100% ACN 12-19 min. El volumen de muestra analizado fue de 10 µl. La concentración de pHPL se calculó integrando el área bajo la curva del pico identificado como pHPL con el *software* Agilent ChemStation (Agilent) y extrapolándola al área obtenida de los picos obtenidos con cuatro concentraciones distintas de pHPL (1,25, 12,5 y 25 mM) (Anexo V).

Con el objetivo de aumentar la volatilidad de los productos orgánicos, la fracción obtenida del pico eluido por HPLC se derivatizó por trimetilsililación. El análisis de dicha fracción se realizó en un equipo de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas Agilent 7980A-5975C específico para el análisis de muestras de bajo peso molecular y equipado con un inyector *split-split* inlet (T = 320 °C P = 12,5 psi) y una columna cromatográfica de polisiloxano HP5 MS de 30 m x 250 µm x 0,25 µm en el Servicio de Cromatografía de Gases del Centro de Investigaciones Biológicas (Madrid) con la colaboración de la Dra. Alicia Prieto. El espectrómetro de masas se ajustó para registrar compuestos de masa molecular en un rango entre 40-500 g/mol.

3.4. Manipulación de ADN.

3.4.1. Aislamiento de ADN.

3.4.1.1. Aislamiento de ADN plasmídico

La purificación de ADN plasmídico a pequeña escala se realizó por el método de lisis alcalina con el kit *High pure Plasmid Isolation Kit* (Roche Applied Science, Penzberg, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.4.1.2. Aislamiento de ADN genómico de promastigotes de *L. infantum*.

El aislamiento se basó en un procedimiento previamente descrito (Sambrook y col., 1989) con las modificaciones que se detallan a continuación. En resumen, se centrifugó a 2.000 g un cultivo de promastigotes de *L. infantum* M/CAN/ES/98/10445 en fase estacionaria durante 10 min a 4 °C y se lavó tres veces con PBS. A continuación, se lisaron 2×10^9 promastigotes utilizando 10 ml de una solución de Tris-HCl 10 mM pH 9,5, EDTA 0,1 M, SDS al 2%, ARNasa pancreática 20 µg/ml y proteinasa K 0,1 mg/ml a 55 °C durante 3 horas. Posteriormente, se añadió un volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico 25:24:1 y se agitó cuidadosamente durante 10 min para formar una emulsión. Seguidamente ésta se centrifugó a 2.000 g durante 15 min y se recuperó la fase acuosa. El proceso de extracción se repitió dos veces hasta la desaparición de la interfase blanca formada fundamentalmente por proteínas. A la fase acuosa resultante se le añadieron 0,1 volúmenes de acetato sódico 3 M y 2,5 volúmenes de etanol absoluto pre-enfriado a -20 °C. La mezcla se incubó a -20 °C durante 1 hora y se centrifugó durante 30 min a 15.700 g. Finalmente, tras realizar un nuevo lavado del sedimento con etanol al 70%, se dejó secar y se resuspendió en agua *milliQ*.

3.4.1.3. Aislamiento de ADN de bazo de ratón.

Para la obtención de ADN genómico a partir de bazo de ratón, se homogeneizaron ~10 mg de órgano y se incubaron a 56 °C durante 16 h con 250 µl de tampón para la homogeneización completa de la muestra (0,4 % SDS, 10 mM EDTA, 30 mM Tris-HCl pH 8,0 y 3 µl de proteinasa K (Sigma)). A continuación, se añadieron 250 µl de acetato de amonio 4 M manteniéndose a TA durante 30 min. Posteriormente, la mezcla se centrifugó a 15.700 g durante 10 min y se recuperó el sobrenadante, al cual se le añadió 1 ml de etanol absoluto pre-enfriado a -20 °C para precipitar el ADN. La mezcla se centrifugó 15 min a 15.700 g y el sedimento se lavó con etanol al 70% enfriado a -20 °C volviéndose centrifugar. Finalmente, el sedimento se secó completamente a TA y se resuspendió en 200 µl de tampón TE (10 mM Tris-HCl pH 8,0 y 1 mM EDTA).

3.4.2 Electroforesis en gel de agarosa.

Las muestras de ADN se prepararon en tampón TE (descrito en el apartado anterior) junto con el tampón de carga 6X de ácidos nucleicos (New England Biolabs). En cada una de las electroforesis de ADN se cargaron 200 ng de marcador *1Kb DNA Ladder* (New England Biolabs). Las electroforesis se llevaron a cabo en las células *Mini-SubCell GT* o *Wide Mini-Sub Cell GT* (BioRad) en geles de agarosa al 1 % p/v en tampón TAE (TrisHCl 40 mM,

EDTA 1 mM, ácido acético 20 mM) con el marcaje de ácidos nucleicos *GelRed*TM (Biotium, Hayward, Estados Unidos) al 0,01% v/v. La electroforesis se desarrolló por aplicación de una corriente eléctrica de 5 V/cm (75 mA) durante 60-90 min con una fuente de alimentación *PowerPac*TM *Basic* (BioRad). Posteriormente, se irradió el gel con luz ultravioleta (UV) bien con el sistema *Gel Doc XR System* y el programa informático *Quantity One* v. 4.6 para la toma de imágenes (BioRad), o bien utilizando el módulo transiluminador *Fotodyne*[®] acoplado a una cámara fotográfica (Fotodyne, Hartland, Estados Unidos) para la toma de imágenes.

3.4.3. Purificación de ADN.

3.4.3.1. Extracción de ADN de gel de agarosa.

Los fragmentos de ADN resueltos por electroforesis en gel de agarosa, se visualizaron en el transiluminador *Fotodyne*[®] y posteriormente se escindió la banda de ADN de interés con un escalpelo. A continuación, el ADN de interés, se extrajo de la agarosa con *QIAquick Gel Extraction Kit* (QIAagen, Hilden, Alemania), y siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.4.3.2. Purificación por precipitación con etanol.

La purificación de muestras de ADN en solución con alto contenido en sales se llevó a cabo por precipitación con 0,1 volúmenes de acetato sódico y 2,5 volúmenes de etanol absoluto pre-enfriado a -20 °C durante una hora. Posteriormente, se centrifugó la muestra a 10.000g y 4 °C, descartándose el sobrenadante y se lavó el sedimento con etanol al 70%. Finalmente, se dejó secar el ADN a TA y se resuspendió en un volumen adecuado de agua *milliQ* según las aplicaciones posteriores.

3.4.4. Clonaje en vectores de expresión.

En la Tabla 2 se muestran los oligonucleótidos y las condiciones de amplificación y de clonaje de los genes utilizados para el desarrollo de este trabajo.

Los oligonucleótidos necesarios para la amplificación por PCR de los genes de interés, fueron diseñados utilizando el programa informático *Geneious* v. 5.5 y fueron sintetizados y purificados por la casa comercial *Ecogen* (Madrid, España). La amplificación de los insertos se llevó a cabo utilizando los oligonucleótidos indicados en la Tabla 2 y con la ADN polimerasa *Kapa HiFi HotStart* siguiendo las instrucciones del fabricante (KapaBiosystems, Wilmington, Estados Unidos). El perfil de ciclos térmicos de las reacciones de PCR se presenta en la Tabla 3 y las temperaturas de hibridación (TH) para cada par de oligonucleótidos se indican en la Tabla 2. Se utilizaron en todos los casos 20 ng de ADN genómico de *L. infantum* como molde. A continuación, se analizaron los productos de PCR mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% y se escindió el inserto de interés (ver apartado 3.3.3.1.). Dicho inserto se precipitó con etanol (apartado 3.3.3.2.) y se digirió utilizando las enzimas de restricción adecuadas para cada caso (Tabla 3) según las indicaciones de la casa comercial (New England Biolabs). Una vez realizada la electroforesis, el inserto digerido se extrajo de la agarosa y se precipitó con etanol. La concentración final de ADN se cuantificó por espectroscopía de absorción UV.

Tabla 2. Condiciones de amplificación y clonaje para cada proteína. TH, temperatura de hibridación. TM, temperatura de fusión. * N/A: No aplica; clonajes realizados con el sistema *In Fusion*[®] (apartado 3.4.4.4.). ** Los insertos se subclonaron en el vector pIR a partir de la digestión del inserto con la enzima BglII que había sido previamente clonado en el vector pJET 1.2 (apartado 3.2.3.6.).

Construcción	ID. del gen de interés	Oligonucleótidos para la amplificación del gen de interés	TH	TM	Dianas de restricción
pRSET-LiTAT	LinJ.36.2490	LiTAT_Fw: 5' - ACGGGATCCACGA TTGATACGCAGGCC - 3'	68 °C	63 °C	GGATCC (BamHI) AAGCTT (HindIII)
		LiTAT_Rv: 5' - ACGAAGCTTCTAC TTCTTGTGGCGCTCGC - 3'		67 °C	
pRSET-LiTAT Tr	LinJ.36.2490 (excluyendo los primeros 114 nucleótidos del CDS)	LiTAT_Tr_Fw: 5' - ACGGGATCCAC GAGTTTTCGCCGTATCGC - 3'	69 °C	66 °C	GGATCC (BamHI) AAGCTT (HindIII)
		LiTAT_Rv: 5' - ACGAAGCTTCTAC TTCTTGTGGCGCTCGC - 3'		67 °C	
pAVA-LiMalDC	LinJ.24.0780	LiMalDC_Fw: 5' - CCCAGGGTCCTGGT TCGTCCCTCCAAAACGATCTGCAC - 3'	70 °C	66 °C	N/A*
		LiMalDC_Rv: 5' - CAAAGCTAGAATAT TCGTACAGAAGGCTGACGTCCAG - 3'		67 °C	
pAVA-LicMDH	LinJ28.3090	LicMDH_Fw: 5' - CCCAGGGTCCTGGTT CGTCCGCTGTGAAGGTGGCC - 3'	72 °C	69 °C	N/A*
		LicMDH_Rv: 5' - CAAAGCTAGAATATT CGTCATAGCCCTGCCTGCGC - 3'		69 °C	
pAVA-LiD2-HADH	LinJ.34.4360	LiD2HADH_Fw: 5' - CCCAGGGTCCTGG TTCGGCCCCCTACCATTTGCGTCTG - 3'	67 °C	67 °C	N/A*
		LiD2HADH_Rv: 5' - CAAAGCTAGAATA TTCGCTAGTAGCCCTTATCCATGC - 3'		60 °C	
pIR-LiTAT**	LinJ.36.2490	LiTAT_pIR_Fw: 5' - ACGGGATCCATG ACGATTGATACGCAGGCC - 3'	68 °C	66 °C	AGATCT (BglII**)
		LiTAT_Rv: 5' - ACGGGATCCCTACTTCT TGTGGCGCTCGCA - 3'		68 °C	
pIR-LiTAT Tr**	LinJ.36.2490 (excluyendo los primeros 114 nucleótidos del CDS)	LiTAT_pIR_Fw: 5' - ACGGGATCCATG ACGAGTTTTCGCCGTATCGC - 3'	68 °C	68 °C	AGATCT (BglII**)
		LiTAT_Rv: 5' - ACGGGATCCCTACTTCT GTGGCGCTCGCA - 3'		68 °C	

Tabla 3. Perfil de ciclos térmicos de las reacciones de PCR para la amplificación de los insertos. *La temperatura de hibridación (TH) aplicada para cada par de oligonucleótidos se indica en la Tabla 2.

Nº de ciclos	1 x	30 x			1 x
Temperatura	95 °C	98 °C	TH*	72 °C	72 °C
Tiempo	5 min	20 seg.	15 seg.	2 min	3 min

3.4.4.1. Preparación de los vectores.

Tras el aislamiento de ADN plasmídico tal y como se detalla en la sección 3.3.1.1., éste se digirió con las enzimas de restricción adecuadas en cada caso (Tabla 2). Para evitar la religación de los vectores utilizados, se defosforilaron los extremos cohesivos 5' con fosfatasa de gamba antártica siguiendo las instrucciones del fabricante (New England Biolabs). El vector digerido y defosforilado se purificó de forma secuencial por extracción del gel de agarosa seguida de precipitación con etanol (apartado 3.4.3.2.). Finalmente, el ADN resuspendido en agua *milliQ*, se cuantificó por espectroscopía de absorción UV.

3.4.4.2. Ligación.

La reacción de ligación se llevó a cabo con la ADN ligasa T4 (New England Biolabs). La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 10 µl a 16 °C durante 16 h. Para el cálculo de la cantidad de inserto y vector empleada en cada caso, se utilizó la Ecuación 1 para determinar la razón molecular vector:inserto, que fue de 1:3 ó 1:6. En todos los casos, se utilizó una cantidad constante de vector (20 ng), a partir de la cual se calculó la cantidad necesaria de inserto. El producto de ligación se utilizó para transformar bacterias *E. coli* DH5α electrocompetentes mediante la aplicación de un pulso eléctrico (apartado 3.2.2.).

Ecuación 1.

$$\frac{ng_{inserto}}{pb_{inserto}} = r \times \left(\frac{ng_{vector}}{pb_{vector}} \right)$$

Siendo r la razón molecular vector:inserto.

3.4.4.3. Sistema de clonaje *In Fusion*®.

Los clonajes con el sistema *In-Fusion HD cloning kit* (Takara-Bio, Kioto, Japón) se desarrollaron con los insertos clonados en el vector pAVA0421 (LinJ.24.0780, LinJ28.3090 y LinJ.34.4360) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la obtención del vector linealizado, éste se amplificó por PCR con los oligonucleótidos 5'-CAAAGCTAGAATATTTCG-3' y 5'-CAAAGCTAGAATATTTCG-3'. El perfil de los ciclos de amplificación de los insertos por PCR se muestra en la Tabla 3 y las TH y TM utilizadas con cada inserto se indican en la Tabla 2.

3.4.5. Secuenciación de ADN.

La comprobación de los clonajes se realizó por secuenciación de los insertos clonados en los vectores plasmídicos utilizando los oligonucleótidos descritos en la Tabla 2. Dicho procedimiento se llevó a cabo según el método de *Sanger* (Sanger y col., 1977) por la empresa *Secugen* S.L. (Centro de Investigaciones Biológicas, Madrid, España), utilizándose los oligonucleótidos empleados para realizar los clonajes (Tabla 2).

3.5. Expresión en sistema heterólogo y purificación de proteínas recombinantes.

3.5.1. Expresión de proteínas recombinantes.

Los preinóculos de los cultivos bacterianos (5-10 ml de cultivo) se iniciaron a partir de las células conservadas a -80 °C en glicerol (apartado 3.2.1.) y se cultivaron durante 16 h a 37 °C. A continuación, se iniciaron los cultivos de 1 L a partir de los preinóculos hasta que alcanzaron una densidad óptica de 0,5 UDO_{600nm} aproximadamente. Seguidamente, se indujo la expresión de las proteínas recombinantes añadiendo 1 mM de isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) e incubando los cultivos durante 2 h a 27 °C en agitación. Transcurrido este tiempo, los cultivos se centrifugaron a 4.000 g durante 15 min a 4 °C. El sedimento de cada cultivo se lavó con un volumen de 50 ml de NaCl al 0,9% y se volvió a centrifugar a 4.000 g durante 15 min a 4 °C. A continuación, el sedimento resultante se resuspendió en 50 ml del tampón de unión adecuado para cada proteína (Tabla 4) y se almacenó a -80 °C.

Las células resuspendidas en el tampón de unión se lisaron en dos ciclos de congelación-descongelación a -80 °C y posterior sonicación durante 10 ciclos de 10 segundos de sonicación seguido de 30 segundos de enfriamiento a 4 °C. Los extractos lisados se filtraron (0,45 μm) y se ajustó a pH 8,0 con HCl 2 M. Los extractos totales se volvieron a filtrar y se almacenaron a 4 °C para purificar las proteínas recombinantes sobre-expresadas.

3.5.2. Purificación por cromatografía de afinidad con níquel.

Todas las purificaciones se llevaron a cabo en condiciones nativas a TA. En primer lugar las purificaciones se optimizaron a pequeña escala utilizando extractos celulares resuspendidos en el tampón de unión correspondientes a cultivos de 0,25 L de *E. coli*. En este caso los extractos, obtenidos como se detalla en la sección 3.5.3.1., se incubaron durante 1 h a 4 °C con agitación suave con 3 ml de la matriz de agarosa con Ni-NTA inmovilizado (Qiagen) las cuales se equilibraron previamente en el tampón de unión correspondiente a la purificación de cada proteína (Tabla 4). Posteriormente, la mezcla se lavó con tampón de unión y la proteína fue eluida con el tampón de elución (Tabla 4) correspondiente a cada proteína con concentraciones crecientes de imidazol (100, 400 y 700 mM), obteniéndose distintas fracciones que fueron analizadas por SDS-PAGE al 10% (apartado 3.4.4.).

Tabla 4. Tampones utilizados en las purificaciones de las proteínas recombinantes. * Un comprimido del *cocktail* de inhibidor de proteasas (Roche) por litro de cultivo.

<u>Proteína recombinante</u>		<u>LiTAT</u>	<u>LiTAT Tr</u>	<u>LiMalDC</u>	<u>cMDH</u>	<u>Lid2-HADH</u>
Tampón de unión	Tris-HCl	20 mM pH 8,0	20 mM pH 8,0	20 mM pH 8,0	20 mM pH 8,0	20 mM pH 8,0
	NaCl	500 mM	500 mM	500 mM	500 mM	500 mM
	Inhibidor de proteasas	1 c./L*	1 c./L*	1 c./L*	1 c./L*	1 c./L*
	PLP	4 µM	4 µM	-	-	-
	NADH	-	-	-	-	0.2 mM
	Imidazol	40 mM	50 mM	30 mM	60 mM	20 mM
Tampón de elución	Tris-HCl	20 mM pH 8,0	20 mM pH 8,0	20 mM pH 8,0	20 mM pH 8,0	20 mM pH 8,0
	NaCl	500 mM	500 mM	500 mM	500 mM	500 mM
	Inhibidor de proteasas	1 c./L*	1 c./L*	1 c./L*	1 c./L*	1 c./L*
	PLP	4 µM	4 µM	-	-	-
	NADH	-	-	-	-	0.2 mM
	Imidazol	500 mM	500 mM	500 mM	600 mM	600 Mm

Para las purificaciones a gran escala se utilizaron los extractos correspondientes a un cultivo de *E. coli* de entre 1 y 3 L. Estas purificaciones se llevaron a cabo en un sistema *FPLC ÄKTA Purifier* o en un equipo *HPLC ÄKTA purifier 10* (GE Healthcare, Little Chalfont, Inglaterra) con columnas empaquetadas *HiTrap FF* de 1 ó 5 ml con níquel (GE Healthcare). El extracto celular correspondiente al cultivo filtrado (apartado 3.5.3.1.) se añadió a la columna con níquel a un flujo de 0,5 ml/min. Posteriormente, se lavó la columna con 30 ml de tampón de unión a un flujo de 1 ml/min en todos los casos. Las proteínas fueron eluidas en fracciones de 0,5 ml que se almacenaron a 4 °C, utilizando un gradiente discontinuo en dos pasos con los tampones de unión y de elución (Tabla 4) y con distintos programas de purificación, en función de la proteína recombinante (Tabla 5).

Tabla 5. Programas de elución utilizados en los equipos de cromatografía líquida para las purificaciones de las proteínas recombinantes.

<u>Proteína recombinante</u>		<u>LiTAT</u>	<u>LiTAT Tr</u>	<u>LiMalDC</u>	<u>cMDH</u>	<u>Lid2-HADH</u>
Paso 1	Tiempo	0-20 min	0-20 min	0-15 min	0-25 min	0-20 min
	Porcentaje de tampón de elución	0-60%	0-60%	0-60%	0-80%	0-60%
	Flujo	0.5 ml/min	0.5 ml/min	0.5 ml/min	0.5 ml/min	0.5 ml/min
Paso 2	Tiempo	20-25 min	20-25 min	15-20 min	25-28 min	20-25 min
	Porcentaje de tampón de elución	60-100%	60-100%	60-100%	80-100%	60-100%
	Flujo	1 ml/min	1 ml/min	1 ml/min	1 ml/min	1 ml/min

Tras las purificaciones, las columnas se regeneraron añadiendo secuencialmente 10 ml de solución de regeneración (Tris-HCl 0,1 M pH 8,0, EDTA 50 mM, NaCl 1 M) con un flujo de 0,5 ml/min, 20 ml de agua *milliQ* añadida con un flujo de 1 ml/min, 5 ml de una solución de sulfato de amonio 75 mM a 0,5 ml/min y 10 ml de sulfato de níquel 100 mM con un flujo de 0,2 ml/min. A continuación, la columna regenerada se almacenó en etanol al 30% [v/v] a 4 °C hasta la siguiente purificación.

3.5.3. Cromatografía de exclusión por tamaño molecular.

Las proteínas LiTAT y LiTAT_Tr, purificadas por afinidad, se purificaron nuevamente por exclusión por tamaño molecular como paso previo a la cristalización para resolver su estructura. Para ello, las fracciones obtenidas con las proteínas recombinante de interés se concentraron utilizando filtros Amicon 15 de 30 kDa (Merck Millipore) y se diluyeron hasta 0,5 ml con tampón SEC (*Size Exclusion Chromatography*) (HEPES 20 mM pH 7,0, NaCl, 300 mM, glicerol 5% [v/v], hidrocloreuro de tris(2-carboxietil)-fosfina 1 mM).

La cromatografía se desarrolló en un equipo HPLC *ÄKTApurifier* 10 (GE, New Jersey, Estados Unidos) a TA en una columna *HiLoad 26/60 Superdex 75 prep-grade* (GE, Estados Unidos) equilibrada previamente en tampón SEC. La curva de calibrado obtenida usando el kit *Low Molecular Weight* (GE, Estados Unidos) permitió, aplicando la Ecuación 3, calcular el coeficiente de distribución (K_{av}) y de este modo definir el estado oligomérico en solución de las proteínas LiTAT y LiTAT_Tr. Las proteínas eluidas fueron concentradas a 4 °C utilizando filtros Amicon de 30 kDa.

Ecuación 2.

$$K_{av} = \frac{(V_e - V_o)}{(V_t - V_o)}$$

V_e , volumen de elución de la proteína; V_o , volumen de vacío de la columna; V_t , volumen total de la columna.

3.6. Producción y purificación de anticuerpos policlonales.

Para la obtención de los anticuerpos policlonales específicos frente a las distintas proteínas estudiadas se inoculó cada una de las proteínas solubles purificadas a dos hembras de conejo (*Oryctolagus cuniculus*) de raza *New Zealand White*. Dichos conejos se mantuvieron durante tres meses en el Servicio de Animalario de Centro de Investigaciones Biológicas (Madrid, España) de acuerdo con los protocolos de bienestar animal de la Unión Europea (Directiva 2010/63/EU).

Los conejos se inmunizaron frente a las proteínas purificadas LiTAT o LiMalDC (apartado 3.5.3.). Antes del inicio de las inmunizaciones, se obtuvieron 5 ml de suero de cada conejo que fue utilizado como suero pre-inmune. Se administró por vía subcutánea una dosis de 0,5 mg/ml de proteína, purificada y dializada frente a PBS a 4°C, junto con el adyuvante completo de *Freund* cada tres semanas durante tres meses (cuatro dosis en total). Tras la cuarta dosis, se extrajeron 5 ml de suero aproximadamente y se tituló el anticuerpo frente a la proteína recombinante purificada y frente a extractos proteicos de *L. infantum*. El sacrificio del animal sedado se realizó mediante punción intracardiaca, obteniéndose aproximadamente 75 ml de suero.

El anticuerpo policlonal anti-LiTAT fue purificado por cromatografía de afinidad con columnas de 1 ml de N-hidroxi-succinimida (NHS) pre-activadas (GE Healthcare). Para ello, en primer lugar la proteína purificada LiTAT se dializó en tripa de diálisis frente al tampón de unión a NHS (NaHCO_3 0,2 M, NaCl 0,5 M a pH 8,0) a 4 °C y en agitación. Tras 2 h, se añadió nueva solución de diálisis y se mantuvo a 4 °C en agitación durante 16-18 h. Posteriormente, se diluyó la proteína con el mismo tampón a una concentración de 1 mg/ml en un volumen final de 1 ml. Por otro lado, para activar la columna de NHS en isopropanol, se añadieron 6 ml de HCl 1 mM enfriado a 4 °C. A continuación, se inyectó en la columna la solución de proteína-ligando dializada y se incubó durante 4 h a 4 °C, permitiendo la unión de las aminas secundarias a los grupos activados de NHS. El exceso de ligando se eliminó aplicando 3 ml de tampón de lavado (NaHCO_3 0,2 M a pH 8,3 y NaCl 0,5M) y, posteriormente, se inactivaron los grupos NHS no unidos, inyectando secuencialmente 6 ml de un tampón para la inactivación de los grupos NHS (etanolamina 0,5 M, NaCl 0,5 M, pH 8,3), 6 ml de tampón ácido (acetato sódico 0,1 M, NaCl 0,5 M, pH 4,0) y de nuevo 6 ml del mismo tampón de inactivación. La columna se incubó en este último tampón a 4 °C durante 4 h y se volvieron a añadir de forma secuencial 6 ml de tampón ácido, 6 ml de tampón de inactivación y otros 6 ml de la solución tamponadora ácida. A continuación, la columna se equilibró con 10 ml de PBS a pH 7,0, y se añadió una solución de 50 ml de anticuerpo policlonal sin purificar diluido diez veces en PBS y filtrado (0,22 μm) a un flujo de 0,5 ml/min. El eluido se recuperó y se volvió a pasar por la columna al mismo flujo. Seguidamente, se lavó la columna de forma secuencial con 20 ml de PBS, 20 ml de tampón de lavado (PBS, KCl 0,5 M) y nuevamente con 20 ml de PBS. Los anticuerpos unidos específicamente se eluyeron en fracciones de 1 ml con 10 ml de tampón de elución (100 mM glicina-HCl, pH 3,0) y se recogieron en tubos conteniendo 1 ml de una solución Tris-HCl 2M pH 8,5 para equilibrar el pH. Las fracciones recogidas se almacenaron a 4 °C para su titulación por *Western blot*.

El análisis de las fracciones recogidas durante el procedimiento de purificación del anticuerpo policlonal anti-LiTAT se llevó a cabo mediante ELISA. Para ello, se tapizaron placas de 96 pocillos de fondo plano con alta capacidad de adsorción (Greiner Bio-one, Alemania) con 100 μl de proteína LiTAT a una concentración de 4 $\mu\text{g/ml}$ en tampón carbonato-bicarbonato (0,1 M NaHCO_3 , 0,034 M Na_2CO_3 , pH 9,6) y se incubaron a 4 °C durante 16 h. A continuación se realizó el bloqueo de las placas con una solución de albúmina de suero bovino (BSA) al 1% (Sigma-Aldrich) en PBS 10X durante 1 h a TA y posteriormente se lavaron tres veces con PBS 0,1% BSA 0,03% Tween 20 (Sigma-Aldrich). Tras los lavados, se añadió el anticuerpo purificado en el paso anterior a una dilución 1:100 en la misma solución de lavado durante 30 min a TA. Se realizaron de nuevo tres lavados con dicha disolución para eliminar los anticuerpos no unidos. Para la detección de las IgG específicas anti-LiTAT se utilizó el conjugado proteína A-peroxidasa (Sigma-Aldrich) a 0,19 $\mu\text{g/ml}$ en solución de lavado y se incubó 30 min a TA. Se lavó nuevamente con solución de lavado (ver más arriba) dos veces y una vez con PBS y, a continuación, se añadieron las pastillas de *o*-fenilendiamina dihidrocloruro (OPD) (DAKO, Agilent, Estados Unidos) disueltas en solución de revelado (ácido cítrico 50 mM, fosfato sódico 0,116 M, H_2O_2 0.03%, pH 5,0) y según las instrucciones del fabricante. La reacción se paró añadiendo 100 μl de 0,5 M de H_2SO_4 . La absorbancia se determinó a 450 nm en un lector de placas *Varioskan*TM *Flash* (Thermo Fisher Scientific).

3.7. Manipulación de proteínas.

3.7.1. Obtención y cuantificación de extractos proteicos totales de *Leishmania* spp.

Se centrifugaron 1×10^8 células, procedentes de cultivo, a 1.500 g, se lavaron tres veces con PBS 1X y finalmente, se resuspendieron en 100 μ l de tampón de rehidratación [urea 8,4 M, tiourea 2,4 M, 1-propanosulfonato de 3-(3-colamidopropil)-dimetilamonio (CHAPS) al 4 % [p/v], azul de bromofenol al 0,0003 % [p/v], DTT 50 mM, Tritón X-100 al 1%, un comprimido del *cocktail* de inhibidores de proteasas (Roche) y nucleasa *Benzonase*[®] 50 μ g/ml (Merck Millipore)]. Se agitaron las muestras suavemente por inversión a 4 °C durante 30 min y los extractos resultantes se centrifugaron 8.000 g a 4 °C durante 10 min, recuperando posteriormente el sobrenadante y almacenándolo a -80 °C.

A continuación, se diluyó una alícuota de la muestra en agua *milliQ* 1:5 o 1:10 y se cuantificó mediante el reactivo de *Bradford* (Bradford, 1976) según las instrucciones del fabricante (Sigma-Aldrich). La lectura de la absorbancia se realizó a 595 nm en un lector de placas *Varioskan*[™] *Flash* (Thermo Fisher Scientific).

3.7.2. Determinación de los niveles de expresión relativa de LiTAT y LiMalDC.

Se separaron los extractos de proteína mediante SDS-PAGE al 10% y se analizaron por *Western blot* siguiendo un protocolo previamente descrito (Gonzalez-Aseguinolaza y col., 1997). Como anticuerpos primarios se utilizaron los policlonales anti-LiTAT (dilución 1:2.000) y anti-LiMalDC (dilución 1:1.000) generados tal y como se detalla en la sección 3.6., el policlonal anti-gGAPDH (1:10.000) proporcionado por el Profesor Paul A. Michels y el anticuerpo monoclonal de ratón anti-6xHis (dilución 1:1.000) (Clontech, Takara-Bio, Japón). Como anticuerpos secundarios, se utilizaron los policlonales de cabra anti-IgG de conejo (dilución 1:2.000) y anti-IgG de ratón (dilución 1:1.000) conjugados a HRP (peroxidasa de rábano) (Dako, Agilent).

La reacción de quimioluminiscencia para el revelado del *Western blot* se llevó a cabo utilizando el reactivo *ECL Western blotting Detection kit* (GE Healthcare) siguiendo las instrucciones del fabricante. La reacción se incubó a temperatura ambiente durante 60 s. Se secó el exceso de reactivo y posteriormente se detectó la señal con el analizador *Image Reader LAS-3000* (GE Healthcare). Los parámetros aplicados para la toma de imágenes de la señal quimioluminiscente fueron 200 s de exposición con una sensibilidad de detección alta. La señal obtenida se visualizó con el *software MultiGauge* v. 2.0. (Fujifilm Life Science, Japón) utilizando un rango de detección de señal de brillo entre 0 y 7.000 en la escala lineal de grises. Tras sustraer la señal de fondo con el *software Quantity One* v. 4.6. (*Image – Subtract background*) se cuantificó la intensidad de la señal obtenida (*View – Plot Density – Density in Box*). La intensidad de señal de las bandas correspondientes a las proteínas se normalizó con la señal correspondiente a la proteína gGAPDH utilizada como control de carga interno en cada muestra y el valor resultante se multiplicó por 100, dando un valor de expresión normalizada frente a la expresión de gGAPDH en porcentaje. El valor final representado gráficamente es la media junto a la desviación estándar de la expresión relativa estimada para tres réplicas biológicas independientes.

3.7.3. Cuantificación de proteínas purificadas.

La concentración de las fracciones de proteína recombinante purificada fue determinada mediante espectroscopía de absorción UV a 280 nm en un espectrofotómetro DU® 530 (Beckman Coulter, Brea, Estados Unidos). Conociendo el coeficiente de extinción molar y el peso molecular de cada proteína y aplicando la ley de *Lambert-Beer* (LLB) (ecuación 3) se calculó la concentración de proteína purificada en mg/ml.

Ecuación 3.

$$C = \frac{A \times M_w}{\epsilon \times l}$$

C, concentración en mg/ml; A, absorbancia (valores entre 0.1-1 UA); Mw, peso molecular de la proteína purificada (g/mol); ϵ , coeficiente de extinción molar ($L \times mol^{-1} \times cm^{-1}$); l, paso óptico de cubeta (1 cm).

3.7.4. Electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)

Los extractos proteicos y las fracciones de proteína purificada fueron resueltos mediante SDS-PAGE en sistema de tampón discontinuo (Laemmli, 1970) con el gel concentrante en la parte superior al 6% de poliacrilamida y el gel separador en la parte inferior al 10 o al 15% (BioRad).

Tras calentar la muestra a 95 °C durante 5 min en tampón de carga en condiciones desnaturalizantes (TrisHCl 0,3 M a pH 6,8, azul de bromofenol 0,0001% [p/v], glicerol al 15% [v/v], SDS al 6% [p/v], ditioneitol (DTT) al 5% [p/v]), la electroforesis se realizó en tampón de electroforesis en condiciones desnaturalizantes (Tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM, SDS al 0,1% [p/v]) en una célula de *MiniProtean*® II (BioRad) a 90 V durante 30 min y a continuación a 120 V durante 2 horas. Se utilizó un marcador de pesos moleculares preteñido, *PageRuler Plus Prestained* (Thermo Fisher Scientific). Las proteínas separadas se tiñeron con el colorante *Coomassie Brilliant Blue* (USB, Cleveland, Estados Unidos). Para la visualización de las proteínas, el exceso de colorante se eliminó incubando el gel teñido durante 10 min con solución de desteñido (ácido acético 3.7% [p/v], metanol 10% en agua bidestilada).

3.7.5. Electroforesis en condiciones nativas (*Novex*® *NativePAGE*).

La electroforesis en condiciones nativas de la proteína LiTAT, se llevó a cabo con el sistema *Novex*® *NativePAGE*™ (Thermo Fisher Scientific). Las muestras en tampón de carga en condiciones nativas (Tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM) se analizaron en geles prefabricados *NativePAGE*™ *Novex*® 3-12% Bis-Tris, de 1 mm de grosor. La electroforesis se llevó a cabo en tampón *NativePAGE Running Buffer* (1X) durante 115 min a 150 V en una célula *XCell SureLock*® *Mini-Cell* a 4 °C. Se utilizó el marcador de pesos moleculares no teñido *NativeMark*™ (Thermo Fisher Scientific). La tinción se llevó a cabo tal y como se describe en el apartado anterior.

3.7.6. Electroforesis bidimensional (2DE).

El análisis de los extractos proteicos purificados por inmunoprecipitación (ver sección 3.9.) fueron resueltos mediante 2DE, que se llevó a cabo en el Servicio de Proteómica del Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC).

En primer lugar, las proteínas fueron separadas en función de su punto isoelectrico (pI) en tiras de gel de isoelectroenfoque (IEF) *ReadyStrip IPG* (BioRad) de 7 cm, con pH comprendido entre 3 y 10 (no lineal) y usando una célula *Protean® IEF* (BioRad) siguiendo las indicaciones del fabricante. Las muestras precipitadas y resuspendidas en tampón de rehidratación para SDS-PAGE (ver sección 3.4.1.) fueron añadidas a las tiras de IEF, por rehidratación activa con la muestra diluida hasta 140 µl en tampón de carga para IEF (urea 7 M, tiourea 2 M, CHAPS al 4 % [p/v], azul de bromofenol al 0,0003 % [p/v]) que contenía DTT 18,2 mM y solución de anfolitos *100X Bio-Lyte 3-10 Ampholyte* al 0,5 % (BioRad), a 50 V y 20 °C durante 16 h. Cada extremo de los geles se situó bajo un electrodo y fue cubierto con aceite mineral (*Biotechnology grade*) (BioRad). Posteriormente, se aplicaron secuencialmente los siguientes pasos de IEF: 250 V/1 h, 500 V/1 h, 1.000 V/1 h y 2.000 V/1 h, todos ellos con pendiente rápida; posteriormente lineal a 8.000 V/1 h., 8.000 V con pendiente rápida hasta alcanzar en ese paso 3.500 V/h., y 200 V hasta superar como mínimo los 10.000 V/h. totales en todos los casos. Todos los pasos se realizaron a 20 °C, y el límite de intensidad máxima fue de 50 µA/gel. A continuación, las tiras fueron equilibradas en 2 ml de tampón de equilibrado para geles 2D (Tris-HCl 50 mM pH = 8,8, urea 6 M, SDS al 2 % [p/v], glicerol al 30% [v/v] y DTT 52 mM) durante 15 min y posteriormente en 2 ml del mismo tampón que contenía yodoacetamida 130 mM otros 15 min, todo ello a TA. Finalmente, se lavó 5-10 min cada tira con 2 ml de tampón de electroforesis (Tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM, SDS al 0,1% [p/v]).

Las proteínas se separaron en función de su tamaño por SDS-PAGE con una concentración constante de acrilamida del 12 % (p/v) en una célula *Miniprotean Dodecacell* (BioRad). Los minigeles se prepararon el día anterior y se conservaron a 4 °C antes de usarlos. Como marcador de masa molecular se empleó *Precision Plus Protein™ Standards Stained* (BioRad). Las tiras equilibradas se depositaron sobre los geles y se realizó la electroforesis a una potencia de 0,5 W/gel los primeros 30 min y posteriormente 1,5 W/gel hasta que el frente de azul de bromofenol llegaba al borde inferior del gel (aproximadamente 1 hora y 30 min).

A continuación los geles se incubaron durante 1 hora en solución de fijación (metanol 40% [v/v]/ ácido acético 10% [v/v]) en agitación suave. Se desechó la disolución de fijación y se añadió la disolución de *SYPRO Ruby* (Thermo Fisher Scientific) manteniéndola en agitación 16 h en oscuridad. Finalmente tras retirar la disolución de *SYPRO*, se añadió la solución de desteñido (metanol 10% [v/v], ácido acético 6% [v/v]) para reducir el fondo y se incubó durante 1 h en oscuridad.

Las imágenes de los geles fueron obtenidas utilizando el equipo *EXQuest™ Spot Cutter* (BioRad), y la identificación de los *spots* se realizó con el programa *PDQuest™ Advanced* v. 8.0.1 (BioRad).

3.7.7. Identificación de proteínas por espectrometría de masas (MS) MALDI-TOF/TOF.

Los *spots* identificados y seleccionados con *PDQuest*TM (BioRad) se escindieron del gel utilizando *EXQuest Spot Cutter* (BioRad). A continuación, se digirieron con tripsina y se prepararon para MS MALDI-TOF/TOF según un protocolo previamente descrito (Alcolea y col., 2014). Seguidamente, se depositó una gota de 0,8 µl de los péptidos de cada *spot* resuspendidos en una placa *OptiTOF* (Thermo Fisher Scientific) junto con una gota de 0,8 µl de una solución de ácido α-ciano-4-hidroxycinámico (Sigma-Aldrich). La mezcla se dejó secar a TA y a continuación se analizaron en un espectrofotómetro de masas ABI 4800 MALDI-TOF/TOF (Thermo Fisher Scientific) en modo reflector positivo a 25 kV para MS y 1 kV para MS/MS. Los espectros se prepararon con el *software ABI 4000 Series Explorer* v. 3.6 (ThermoFisher Scientific). Las huellas peptídicas y los espectros de fragmentación se analizaron utilizando el programa MASCOT v. 2.1 con el servidor *Global Protein Explorer* v. 4.9 (Thermo Fisher Scientific) frente a la base de datos *NCBIInr*.

3.8. Análisis de la localización subcelular de las proteínas de *L. infantum*.

3.8.1. Inmunofluorescencia indirecta.

Las preparaciones para inmunofluorescencia indirecta (IFI) se realizaron sedimentando 2×10^5 promastigotes sobre un área circular de 0,2 cm² en un portaobjetos. Posteriormente, se fijaron las células con una solución de paraformaldehído al 4% durante 5 min a TA. Los portaobjetos con la muestra fijada se lavaron tres veces con PBS en una jarra *Coplin* durante 5 min. Las células se permeabilizaron durante 5 min con Triton X-100 al 0,5% en PBS y se realizaron tres lavados más en PBS. A continuación, se incubaron las células con solución de bloqueo (*Tween* 20 0,1% y leche desnatada 5% en PBS) a 37 °C y en una cámara húmeda. Tras eliminar el exceso de solución de bloqueo, se incubaron las preparaciones con el anticuerpo primario (anti-LiTAT purificado por afinidad) a una dilución 1:50 en la misma solución de bloqueo y se hicieron de nuevo tres lavados de 5 min con PBS 1X. Tras el último lavado se incubaron los portaobjetos durante 1 h a TA y en oscuridad con el anticuerpo secundario de cabra (anti-IgG de conejo conjugado con el fluoróforo Alex- 488) a una dilución 1:200 en solución de bloqueo. En los últimos 10 min de la incubación con el anticuerpo secundario, se añadieron 10 µl de una disolución de 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI) (Thermo Fisher Scientific) a 10 µg/ml en PBS. Finalmente, se hicieron cuatro lavados con PBS en oscuridad y se realizó el montaje con *Mowiol*[®] 4-88 (Sigma-Aldrich). En paralelo se llevaron a cabo los controles negativos omitiendo la incubación con el anticuerpo primario. Para la detección de fluorescencia se utilizó un microscopio laser confocal espectral *Leica TCS-SP5-AOBS* en el Servicio de Microscopía Confocal del Centro de Investigaciones Biológicas (Madrid, España) a 630X. Los parámetros de intensidad del láser y de ganancia se ajustaron a cero con el control negativo (suero preinmune).

3.8.2. Extracción fraccionada de proteínas de *L. infantum* con digitonina.

Para el análisis de la localización subcelular mediante un gradiente fraccionado con digitonina, se siguió un procedimiento previamente descrito para *L. infantum* (Hide y col., 2008). En primer lugar, se centrifugaron 2×10^8 promastigotes de *L. infantum* a 2.000g durante 10 min y se lavaron tres veces con PBS. El sedimento obtenido se resuspendió en 1,25 ml de tampón THB (*Trypanosome Homogenization Buffer*) compuesto por Tris-HCl 25 mM

pH 7,8, EDTA 1 mM, sacarosa 0,6 M, ditioneitol (DTT) 1 mM, y un comprimido del *cocktail* de inhibidores de proteasas (Roche). Se lisaron las células por sonicación durante 10 s y se determinó la concentración de proteínas mediante el método de *Bradford* siguiendo las instrucciones del fabricante (Sigma-Aldrich). A continuación, se prepararon ocho alícuotas con la suspensión de células a las que se añadieron concentraciones crecientes de digitonina (0, 0,05, 0,1, 0,25, 0,5, 1, 5 y 10 mg de digitonina/mg de proteína total) en un volumen final de 250 µl por alícuota. Las mezclas resultantes se incubaron durante 2 min a 37 °C y posteriormente se centrifugaron a 20.800g durante 10 min a 4 °C. De cada alícuota se recuperará el sobrenadante y el precipitado. Éste último fue resuspendido en 250 µl de tampón THB. Tanto los sobrenadantes como los sedimentos resuspendidos se precipitaron con ácido tricloroacético y se volvieron a resuspender en agua *milliQ*. La concentración de proteína de cada uno de los sobrenadantes y de los sedimentos fue nuevamente cuantificada por el método de *Bradford*.

3.9. Inmunoprecipitación de LiTAT en extractos de promastigotes.

Para el ensayo de inmunoprecipitación en condiciones nativas se utilizaron extractos de promastigotes de *L. infantum* en fase logarítmica temprana. Para ello, se centrifugaron 1×10^9 promastigotes a 1.500 g durante 10 min y se lavaron tres veces con PBS. A continuación, los promastigotes se incubaron durante 1 h a 4 °C y con agitación rotacional con 1 ml de tampón de lisis no desnaturante (Tris-HCl 25 mM a pH 8,0, NaCl 100 mM, glicerol 10%, Nonidet P-40 0,5% (Sigma), MgCl₂ 5 mM, DTT 1 mM y un comprimido de *cocktail* de inhibidores de proteasas (Roche) (Dey y col., 2010). A continuación, se centrifugó el lisado a 12.000 g y 4 °C durante 10 min y se recuperó el sobrenadante con los lisados celulares.

Los extractos totales de proteína se preaclaron añadiendo 50 µl de suero preinmune (apartado 3.6.1.) y se incubaron en hielo durante 1 h. Posteriormente, se incubó la mezcla durante 30 min a 4 °C y con agitación suave, con 100 µl de esferas de *Sepharose*TM unidas a proteína A (Sigma-Aldrich) previamente hidratadas en una solución de PBS 1X y lavadas dos veces con 100 µl del tampón de lisis no desnaturante. A continuación, se centrifugó la mezcla a 14.000 g y 4 °C durante 10 min y se recuperó el sobrenadante con los extractos proteicos preaclados, los cuales se conservaron a 4 °C.

Por otro lado se realizó el entrecruzamiento de la proteína A, unida a las esferas de *Sepharose*TM, con el anticuerpo policlonal purificado según se indica en el apartado 3.6. y con el suero preinmune. En primer lugar se prepararon dos soluciones de anticuerpos, una utilizando 1 µg del policlonal purificado por afinidad y otra usando 5 µl del suero preinmune. Ambas se diluyeron en 100 µl de tampón de dilución (0.1% de BSA [p/v] en PBS 10X) y se mezclaron en proporción 1:1 con una solución de esferas de *Sepharose*TM unidas a proteína A. Las dos mezclas se incubaron por agitación suave a 4 °C durante 1 h, tras lo cual se centrifugaron a 1.000 g y se descartó el sobrenadante. A continuación, las esferas se lavaron primero con 100 µl de tampón de dilución durante 5 min a 4 °C con agitación suave y a continuación con 100 µl de PBS 1X a 4 °C.

Para evitar la liberación de las inmunoglobulinas de la proteína A, se entrecruzaron con un agente bifuncional, el dimetil-pimelimidato (DMP) (Sigma-Aldrich) siguiendo un procedimiento de intercalación previamente descrito con ligeras modificaciones (Chernukhin y Klenova, 2000) que se resume a continuación. Se preparó una disolución de 13 mg/ml de DMP en agua *milliQ* y se mezcló por agitación vigorosa en proporción 1:1 con solución de lavado (trietanolamina 0.2 M en PBS). Dicha mezcla se incubó 30 min a TA con agitación suave por rotación y, a

continuación se incubaron las esferas con 100 µl de solución de lavado 5 min en rotación. El procedimiento de intercalación se repitió dos veces más de modo idéntico y tras el último paso de lavado, los grupos funcionales del DMP no unidos se inactivaron incubando las esferas con 100 µl de tampón de inactivación (etanolamina 50 mM en PBS) durante 5 min a TA por agitación. Este paso de inactivación se repitió una vez más y, a continuación, se lavaron las esferas con 100 µl de PBS 10X. Aquellas inmunoglobulinas no unidas de forma covalente a la proteína A por el agente intercalante, se eliminaron incubando las esferas de *Sepharose*TM con 100 µl de una solución de glicina 1M pH 3,0 durante 10 min a TA en rotación. Este último paso se repitió una vez más y finalmente, las esferas se lavaron tres veces con 100 µl del tampón de lisis no desnaturizante.

Los extractos proteicos preaclerados se añadieron a las esferas de *Sepharose*TM con proteína A e inmunoglobulinas unidas de forma covalente y se incubaron a 4 °C durante 16 h en rotación. Esto permitió el reconocimiento específico de los antígenos por las inmunoglobulinas inmovilizadas en las esferas. La mezcla se centrifugó a 1.000 g durante 10 min y se recuperó el sedimento con las esferas. A continuación, se añadió una solución con glicina 0,1 M pH 3,0 y se incubó durante 5 min a 4 °C en rotación. Finalmente, la mezcla se centrifugó a 1.000 g recuperándose el sobrenadante. Este paso se repitió dos veces más y los sobrenadantes obtenidos se mezclaron y se almacenaron a -80 °C para su análisis posterior por 2DE (apartado 3.7.6.) y por MALDI-TOF/TOF (apartado 3.7.7.).

3.10. Ensayos de actividad.

3.10.1. Transaminación de tirosina *in situ*

Para el cálculo de las tasas de transaminación de la tirosina en extractos totales de *L. infantum*, se aislaron 2 x 10⁸ promastigotes en fases logarítmica temprana (día 1), logarítmica tardía (día 3) y estacionaria (día 6) desde un cultivo iniciado a 2 x 10⁶ células /ml. Las células fueron lavadas tres veces con PBS y se lisaron utilizando un tampón de lisis en el que se conserva la actividad enzimática de las proteínas (TrisHCl 50 mM pH 7,4, EDTA 2 mM, triton X-100 0,2% [v/v]) (Schadewaldt y Adelmeyer, 1996). La concentración de proteínas en los extractos se cuantificó por el método de Bradford a partir de una recta de calibrado obtenida por regresión lineal de las medidas de A_{595nm} de diluciones seriadas de BSA. La actividad tirosina aminotransferasa se evaluó a partir de 100 µg de proteína total utilizando como sustratos tirosina y piruvato, y se ensayó según se ha descrito previamente en un ensayo colorimétrico midiendo la conversión de pHPP en p-hidroxibenzaldehído a 331 nm en un espectrofotómetro DU[®] 530 y por aplicación de la LLB (apartado 3.7.3.) sin la adición de dietil tiocarbamato sódico (Diamondstone, 1966). Una unidad de actividad enzimática se define, en este caso, como la cantidad de tirosina aminotransferasa que cataliza la formación de 1 µmol de pHPP por minuto. En cada experimento se llevaron a cabo cuatro réplicas biológico-técnicas.

3.10.2. Deshidrogenación de pHPP *in situ*.

La determinación de la tasa de deshidrogenación de pHPP se realizó siguiendo un protocolo previamente descrito (Montemartini y col., 1994b) con pequeñas modificaciones, usando pHPP comercial (Sigma-Aldrich). El descenso en la absorbancia a 340 nm se midió durante los primeros 5 min de la reacción en un espectrofotómetro

Cary4000 (Agilent) a 27 °C. Se aislaron promastigotes en fase logarítmica temprana, logarítmica tardía y estacionaria y se lisaron en el tampón indicado en el apartado anterior (TrisHCl 50 mM a pH 7,4, EDTA 2 mM, triton X-100 0,2%). La cuantificación de proteínas se hizo tal y como se ha indicado en el apartado anterior, si bien en este caso se usaron 200 µg de proteína total por ensayo. Una unidad de actividad enzimática se define, en este caso, como la cantidad de deshidrogenasa que cataliza la formación de 1 µmol de pHPL por minuto. El valor final obtenido es la media de cuatro réplicas biológico-técnicas independientes.

3.10.3. Análisis de la actividad enzimática de LiTAT recombinante.

Para el análisis de la actividad enzimática específica de LiTAT y LiTAT_Tr se utilizó en todos los casos la misma fracción de proteína purificada cuantificada según se describe en la sección 3.7.3.

La actividad de LiTAT se calculó a partir de las medidas espectrofotométricas obtenidas en un equipo Cary4000 a 331 nm según el método de Diamondstone sin la adición de dietil tiocarbamato sódico (Diamondstone, 1966). Una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de proteína LiTAT que cataliza la formación de 1 µmol de pHPP por minuto. Se llevaron a cabo cuatro réplicas técnicas de cada experimento.

3.10.4. Análisis de la actividad enzimática de deshidrogenación con enzimas recombinantes.

La actividad enzimática de las distintas deshidrogenasas estudiadas en el presente estudio fue analizada siguiendo un ensayo espectrofotométrico previamente descrito (Montemartini y col., 1994b). Las proteínas se cuantificaron tal y como se describe en la sección 3.7.3. Se llevaron a cabo cuatro réplicas técnicas de cada experimento.

3.11. Calorimetría diferencial de barrido (DSF).

Las muestras para el análisis de la estabilidad térmica de las proteínas se prepararon en placas de 96 pocillos. En un volumen final de 10 µl se preparó la mezcla de reacción con una concentración final de proteína de 50 mM en el tampón adecuado para el ensayo (TrisHCl 20 mM pH 8,0, NaCl 0,5 M, PLP 4 mM, Sypro Orange 40X). A la mezcla de reacción se añadió SYPRO Orange 1X (Sigma-Aldrich). El ensayo se llevó a cabo en un termociclador para PCR en tiempo real iQ5 (BioRad) en el Servicio de Proteómica del Centro de Investigaciones Biológicas (Madrid, España). Para el ensayo se utilizó una rampa de temperatura de 1 °C en un intervalo de temperaturas entre 25 y 95 °C.

3.12. Resolución de la estructura de LiTAT mediante cristalografía de rayos X.

3.12.1. Condiciones de cristalización y de difracción.

Las proteínas LiTAT y LiTAT_Tr fueron purificadas por cromatografía de afinidad seguida de exclusión molecular y los ensayos para determinar las condiciones de cristalización se hicieron a una concentración de 21,0 y 21,3 respectivamente mg/ml en tampón SEC (Zhang y col., 2011). Se comprobó por densitometría que la pureza de las proteínas LiTAT y LiTAT_Tr era superior al 95%.

Los ensayos de cristalización se llevaron a cabo en el laboratorio *Emerald Biostructures* (Bainbridge Island, Washington, Estados Unidos) utilizando las matrices dispersas JCSG+, MCSG1 (Emerald Bio), *Morpheus* y PACT (*Molecular Dimensions*) según la técnica de difusión de vapor en gota sentada (*sitting drop*). En resumen, se diluyeron gotas de 0,4 µl con la solución de proteína en el mismo volumen de la solución precipitante y se equilibraron frente a 80 µl de dicha solución en placas de 96 pocillos *Compact Junior* (Rigaku Reagents, Estados Unidos). Los cristales de LiTAT_Tr obtenidos con la condición de la matriz *Morpheus* B11 (10% polietilenglicol 4.000, 20% glicerol, 30 mM NaF, 30 mM NaBr, 30 mM NaI, 100 mM Bicine/Tris-HCl pH 8,5) fueron vitrificados sumergiéndolos en nitrógeno líquido y se mantuvieron criopreservados. Los datos de difracción de rayos X se obtuvieron en la estación LS-CAT (Life Sciences Collaborative Access Team, Estados Unidos) 21 ID-F de la fuente de radiación sincrotrón de rayos X *Advanced Photon Source* (Argonne National Laboratory, Lemont, Illinois, Estados Unidos) a una temperatura de -173 °C y utilizando un detector *Rayonix MX-225*. Los datos de difracción se redujeron con el programa *XDS suite* (Kabsch, 2010) hasta 2,35 Å de resolución.

3.12.2. Determinación de la estructura de LiTAT.

La resolución de la estructura de LiTAT se llevó a cabo por reemplazamiento molecular utilizando como modelo la estructura de TAT de *T. cruzi* (PDB: 1BW0) (Blankenfeldt y col., 1999) con el programa *Phaser* del servidor CCP4 (<http://www.ccp4.ac.uk>) (McCoy y col., 2007). Las fases de reemplazamiento molecular se mejoraron a través de dos ciclos de promediado molecular NCS (*Non-crystallographic symmetry*) con el *software Parrot* del servidor CCP4 (Cowtan, 2010). Posteriormente, se elaboró un modelo inicial utilizando el *software Buccaneer* (Cowtan, 2006). La estructura final se obtuvo tras numerosos ciclos iterativos de refinamiento con el programa *Phenix.refine* (Adams y col., 2010) y modelado manual con el *software Coot* (Emsley y col., 2010). El límite de resolución para el mejor modelo fue de $I/\sigma(I) > 2$, siendo I la media de las intensidades y σ la desviación estándar del grupo de reflexiones utilizadas. La validación de la estructura final se realizó con el *software Molprobity* (<http://www.molprobity.biochem.duke.edu>) (Chen y col., 2010). Los valores de R_{merge} y R_{work} fueron calculados con las ecuaciones. El factor R_{free} fue calculado con la misma ecuación usando el 20% de las reflexiones que fueron omitidas del refinamiento.

Ecuación 4.

$$R_{merge} = \frac{\sum_h \sum_i |I_i(h) - \langle I(h) \rangle|}{\sum_h \sum_i I_i(h)}$$

R_{merge} , factor de acuerdo entre las múltiples medidas obtenidas durante la difracción; $I_i(h)$, intensidad de simetría o de reflexión; $\langle I(h) \rangle$, Intensidad de una única reflexión.

Ecuación 5.

$$R_{work} = \frac{\sum_{hkl} |F_{obs}| - |F_{calc}|}{\sum_{hkl} |F_{obs}|}$$

R_{work} , factor de desacuerdo entre el 80% de las observaciones experimentales; F_{obs} , factor estructural observado; F_{calc} , factor estructural calculado

Los factores estructurales y las coordenadas de la estructura se depositaron en la base de datos PDB con el código 4IX8 (<http://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=4IX8>).

3.13. Modelado de la estructura de LiMalDC.

La estructura de LiMalDC se modeló utilizando el programa informático *CPH Models* v. 3.2 disponible en el servidor www.cbs.dtu.dk/services/CPHmodels/ (Nielsen y col., 2010) y utilizando como modelo la estructura de la enzima málica humana (PDB: 2AW5) con un 40% de identidad de secuencia. Para validar el modelo obtenido se analizaron las interacciones atómicas de la estructura con el programa *Errat* v. 2.0 disponible en el servidor services.mbi.ucla.edu/ERRAT/ (Colovos y Yeates, 1993) y las posiciones de los ángulos Ψ y Φ con el gráfico de Ramachandran obtenido analizando el modelo con el servidor mordred.bioc.cam.ac.uk/rapper/rampage.php (Lovell y col., 2003).

3.14. Simulaciones por acoplamiento molecular *in silico*.

Los estudios de acoplamiento molecular *in silico* se desarrollaron en el departamento de bioinformática del Centro de Investigaciones Biológicas (Madrid, España) con la ayuda del Dr. Mario García Lacoba.

Los complejos de LiTAT con los distintos estados de transición (aldimina externa formada por la tirosina unida al PLP y el PMP en forma libre y con los distintos oxoácidos unidos) fueron obtenidos por acoplamiento molecular *in silico*, utilizando el *software Discovery Studio 4.9* (Accelrys Software Inc., San Diego, Estados Unidos) y utilizando el algoritmo *CDocker* (Wu y col., 2003). Las moléculas utilizadas en los ensayos se prepararon a partir de la estructura de los compuestos en formato *SMILES* y utilizando la herramienta *Smi2Depict* (Chen y col., 2007). La predicción de las disposiciones y conformaciones adoptadas por los complejos formado por el modelo de LiMalDC con los distintos ligandos, generados con la herramienta *Smi2Depict*, se obtuvieron del mismo modo con el algoritmo *CDocker*.

3.15. Evaluación de la protección conferida por LiTAT frente a la infección experimental por *L. infantum*.

3.15.1. Diseño experimental.

Se consideraron tres grupos de ratones: grupo control negativo (no inmunizados ni infectados), grupo control positivo (infectados y no inmunizados) y grupo experimental (inmunizados con LiTAT e infectados). Se administraron por vía subcutánea cuatro dosis de 10 μ g de proteína, una cada dos semanas (Figura 11). Transcurridas cuatro semanas desde la última inoculación de LiTAT, los ratones de los grupos control positivo y experimental se infectaron cada uno con 10^4 promastigotes de *L. infantum* en fase estacionaria por vía intravenosa. Los animales se sacrificaron a los dos meses tras la infección por dislocación cervical e inmediatamente se extrajo el bazo de cada ratón, se pesó y se almacenó a -80 °C para posteriormente aislar el ADN total de la muestra (apartado 3.3.1.3.).

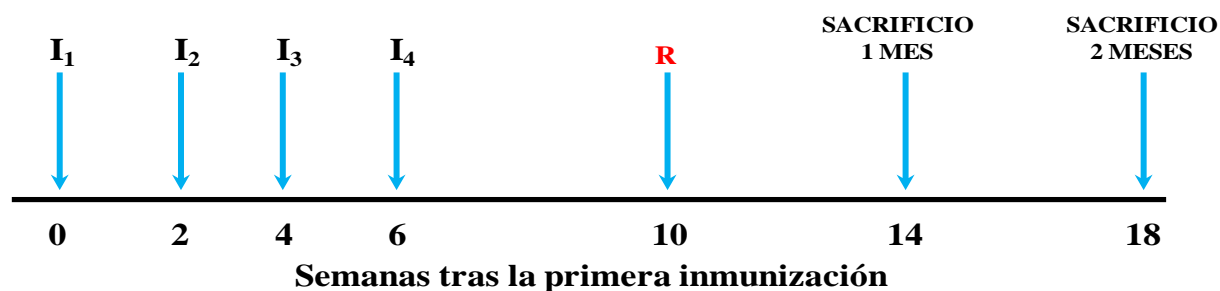


Figura 11. Cronograma del experimento de inmunización de ratones con LiTAT frente a la infección experimental con *L. infantum*.
I: inmunización; R: reto/infección.

3.15.2. Evaluación de la carga parasitaria mediante PCR cuantitativa (qPCR).

El análisis de la carga parasitaria en el bazo se realizó mediante qPCR utilizando el método de las sondas *TaqMan*[®] para la cuantificación del ADN del parásito (Francino y col., 2006). Para ello, en una placa de 384 pocillos se prepararon cuatro diluciones seriadas 1:5 por triplicado a partir de una concentración de 20 ng/μl de ADN de bazo de ratón, aislado según se describe en el apartado 3.3.1.3. La mezcla de reacción de cada pocillo tenía un volumen final de 10 μl y constaba de los siguientes componentes: 5 μl *TaqMan Fast Universal PCR Master Mix* (2X) (Thermo Fisher Scientific), 0,5 μl de mezcla oligonucleótidos específicos, 2,5 μl de agua libre de ARNasas (*Ambion RT-PCR Grade Water* - Thermo Fisher Scientific) y 2 μl de ADN a una concentración conocida. Los oligonucleótidos utilizados para amplificar el ADN de una región de 120 pb conservada en los minicírculos del parásito, considerándose como el gen de interés (GOI) fueron: *Leish-1* 5'-AACTTTTCTGGTCCTCCGGGTAG-3'; *Leish-2* 5'-ACCCCCAGTTTCCCGCC-3'. La sonda prediseñada *TaqMan*[®] de ARN 18S (Thermo Fisher Scientific) se usó como control para normalizar la cantidad del ADN durante el análisis de la carga parasitaria (ver más abajo). La amplificación por qPCR se realizó en un sistema *7900HT Fast Real-Time PCR* (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos) en la Unidad de Genómica del Parque Científico, en la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Complutense de Madrid.

La cuantificación de la carga parasitaria normalizada (Qn) se realizó mediante el método ΔC_t (*cycle threshold*) corregido con la eficiencia y normalizando los resultados obtenidos frente al gen de referencia (GOR).

Los valores de C_t obtenidos por qPCR se extrapolaron por regresión lineal y se calcularon las medias aritméticas de las réplicas de cada dilución y su desviación estándar. Por otro lado también se calculó el coeficiente de variación CV según la ecuación 6. Se eliminaron aquellos puntos cuyo CV era superior al 20%.

Ecuación 6.

$$CV (\%) = (SD_{\text{dilución}} / Ct_{\text{medio dilución}}) \times 10$$

CV, coeficiente de variación; SD, desviación estándar; C_t , *cycle threshold*.

A continuación se calculó la eficacia de amplificación de forma independiente para cada muestra biológica a partir de los datos de las correspondientes réplicas técnicas y las diluciones seriadas. Dicha eficacia se calculó

representando el valor de Ct frente al log de la masa total de molde añadida a la mezcla de reacción y aplicando la ecuación 7.

Ecuación 7.

$$Eficiencia = 10^{(-1/pendiente)}$$

La cantidad de ADN corregida con la eficiencia para cada uno de los valores (Q) se calculó aplicando la ecuación 8.

Ecuación 8.

$$Q = Eficiencia^{-Ct}$$

Q, cantidad de ADN; Ct, *cycle threshold*.

Finalmente, los valores de cantidad normalizada (Qn) se obtuvieron al dividir los valores de Q del gen de interés entre los valores de Q del GOR. Para calcular la desviación estándar de la Qn (SD_{Qn}) se aplicó la ecuación 9.

Ecuación 9.

$$SD_{Qn} = Qn \cdot [(SD_{GOI}/Q_{GOI})^2 + (SD_{GOR}/Q_{GOR})^2]^{1/2}$$

SD_{Qn} , desviación estándar de la cantidad de ADN; Qn, cantidad de ADN normalizada; SD_{GOI} , desviación estándar de la cantidad de ADN del gen de interés; Q_{GOI} , cantidad de ADN del gen de interés; SD_{GOR} , desviación estándar de la cantidad de ADN del gen de referencia; Q_{GOR} , cantidad de ADN del gen de referencia.

Para contrastar si existían o no diferencias significativas entre el grupo inmunizado y el grupo control positivo se aplicó el test de muestras independientes, U de *Mann-Whitney* (contraste no paramétrico) de dos colas (*two-tailed*), que asume como hipótesis nula la igualdad de las medianas. Los estadísticos se calcularon utilizando el servidor <http://www.socscistatistics.com/tests/mannwhitney/Default2.aspx> para evaluar la significación estadística de los datos. Los datos de Qn de cada grupo se muestran en un gráfico de cajas y bigotes obtenido con el *software* *BoxPlotR* (<http://www.boxplot.tyerslab.com>) tras introducir los datos de Qn.

Resultados

4.1. Estudio de la secuencia de LiTAT, clonaje y purificación.

4.1.1. Análisis de la secuencia de LiTAT.

La secuenciación del genoma de *L. infantum* (Peacock y col., 2007) permitió la identificación del único gen codificante de la proteína LiTAT anotado en la base de datos *GeneDB* (Logan-Klumper y col., 2011) con el identificador Lin.J36.2490. Este gen consta de 1.347 pb y codifica para una proteína cuyo peso molecular teórico es de 49,7 kDa. El punto de unión del *splice leader* al ARN policistrónico se encuentra 211 nucleótidos corriente arriba del codón AUG iniciador de la traducción (NCBI, *Sequence Read Archive*, Id. ERX490118).

El transcrito de LiTAT en fase logarítmica temprana está entre el 5% con mayor abundancia relativa de todo el transcriptoma de *L. infantum* (expresada como la mediana del número de lecturas por ARNm) (base de datos NCBI – GEO GSM1176999) (Martin y col., 2014).

El alineamiento de la secuencia de aminoácidos de LiTAT con las correspondientes secuencias ortólogas de otros tripanosomátidos indica que la proteína está muy conservada dentro del género *Leishmania* (>80% de identidad de secuencia) (Figura 12), pero no ocurre lo mismo con la secuencia del ortólogo *T. cruzi* (la identidad de secuencia es inferior al 45%).

En las especies del género *Leishmania*, existe un único gen anotado como TAT en la base de datos *GeneDB*. Sin embargo, en el genoma de *T. cruzi* hay anotados 12 genes de TAT con distintas secuencias (Anexo I). Para realizar el alineamiento con LiTAT, de las 12 copias existentes en *T. cruzi*, se seleccionó aquella que se encontraba en el *locus* correspondiente a LiTAT en el genoma de *T. cruzi* CL Brener y que se ha estudiado más en profundidad (TcCLB.510187.50). En el genoma de *T. brucei* no existen genes anotados como tirosina aminotransferasa. Para identificar posibles homólogos de LiTAT en esta especie, se realizó un alineamiento del gen Lin.J36.2490 frente al genoma completo de *T. brucei* cepa TREU 927. De este modo se confirmó la ausencia de secuencias en *T. brucei* homólogas a LiTAT, habiendo un *gap* en el *locus* correspondiente en *T. brucei*.

En el gen codificante de la proteína LiTAT, existe un extremo N-terminal de 39 aminoácidos cuya secuencia está muy conservada en el género *Leishmania* pero que no se encuentra en el ortólogo de *T. cruzi*. Además, este dominio presenta un elevado porcentaje de residuos de Ser y Thr susceptibles de ser fosforilados. Todas las secuencias de tirosina aminotransferasas alineadas tienen un residuo Lys catalítico, esencial para la unión covalente a la coenzima PLP (Lys286 en LiTAT) (Figuras 12 y 13). En *Leishmania* los residuos encargados de la estabilización de la coenzima y la unión de sustratos previamente descritos (Sobrado y col., 2003) están mayoritariamente conservados. Los únicos residuos no conservados en tripanosomátidos que participan en la estabilización del PLP son la Ile222 y la Phe379 de LiTAT, sustituidos en *Trypanosoma* por Thr y Tyr respectivamente. Además, en *Leishmania* no se encuentran los residuos próximos al extremo N-terminal que participan en el reconocimiento y el posicionamiento de los sustratos en el centro activo en la TAT de *T. cruzi* y en su lugar están sustituidos por Gln55 y Asn58 en LiTAT. La Arg423 que se ha propuesto como responsable del posicionamiento de los sustratos oxoácidos (Sobrado y col., 2003) está conservada en todas las secuencias alineadas.

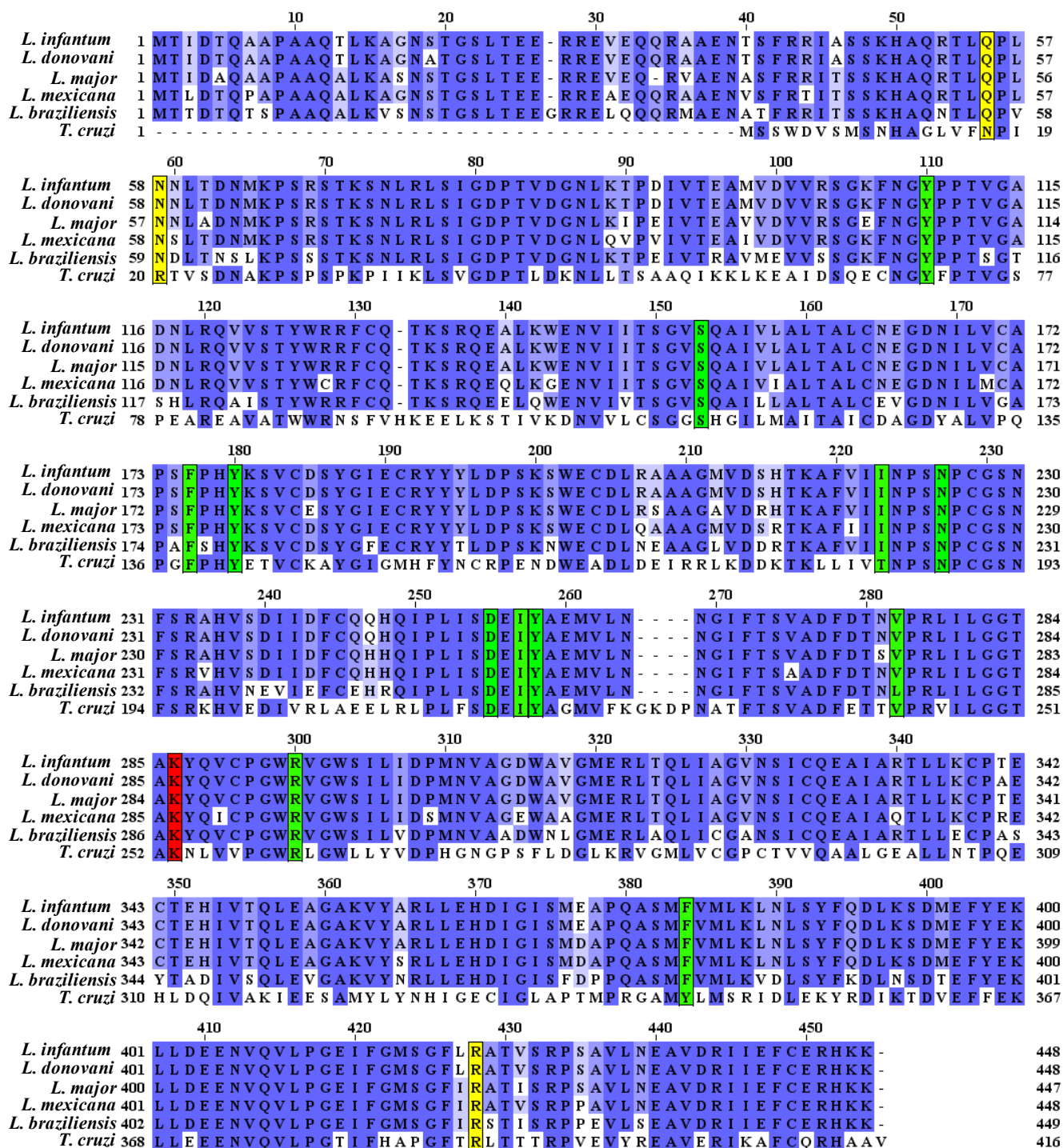


Figura 12. Alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos de las proteínas anotadas como tirosina aminotransferasa en distintas especies de la familia Trypanosomatidae. El sombreado en azul indica el grado de conservación entre las secuencias alineadas (a mayor intensidad de azul mayor es el grado de conservación). Bajo el alineamiento múltiple de secuencias, se muestra la secuencia consenso. El residuo de lisina que participa en la unión covalente con la coenzima PLP en todas las aminotransferasas se destaca en rojo. En verde se indican los residuos que participan en la estabilización de la coenzima. Los aminoácidos implicados en la unión y especificidad del enzima por los sustratos α -oxoácidos se señalan en amarillo.

Al comparar la secuencia de aminoácidos de LiTAT con las tirosina aminotransferasas de mamíferos o el de otros organismos modelo (*Caenorhabditis elegans* y *Arabidopsis thaliana*), el porcentaje de identidad de secuencia es inferior al 50%, aunque los residuos que participan en la estabilización de la coenzima se conservan (Figura 13). Además las TAT de mamíferos también presentan un extremo N-terminal con una extensión similar al extremo presente en LiTAT, aunque su secuencia de aminoácidos es diferente a la del gen de *Leishmania*.

		10	20	30	40	50				
<i>L. infantum</i>	1	- - - -	MT ID TQAAPAAQT LKA -	GNSTGSLTEERREVE	EQQRAAENTSFRR	IAS	SSKHAQRTL	54		
<i>H. sapiens</i>	1	MDPYMI	IQMS SKGNLPS IL D - - - -	VHVNVGGRSS	SVPGKMKGRKAR	WSVRPSD	-MAKKT	53		
<i>M. musculus</i>	1	MDSYVI	QTNVNDSPSVLD - - - -	VRVNI	GGRSSVQGRAKGRKAR	WNVRPSD	-MSNKT	53		
<i>C. elegans</i>	1	MQTLM	SH - SRITPLPGAITKEE	IKNQLLVHER	R - - FL	SKPNRKDQWN	VLPQSAHSKNT	56		
<i>A. thaliana</i>	1	- - - -	MN - - - - - - - - - -	- - - -	HNSNLVLP	SHQTETQTQDET	DISVWRFRGSD	NAAKASS	40	
		60	70	80	90	100	110			
<i>L. infantum</i>	55	QPLN	N - - - -	LT	DNMKP -	SRSTKSN	LRSLIGDPTVD	GNLKT	PD	108
<i>H. sapiens</i>	54	NPIRA	- - - -	IV	DNMKVKPNPNK	TMISLS	IGDPTVFGNLP	TDPEVT	QAMKD	108
<i>M. musculus</i>	54	NPIRA	- - - -	IV	DNMKVKPNPNK	TMISLS	IGDPTVFGNLP	TDPEVT	QAMKD	108
<i>C. elegans</i>	57	NPVRK	- - -	IAD	ACAVPPHPEK	KVIKHL	GDPSV	GCKLPPSE	IAVQAMHESVS	111
<i>A. thaliana</i>	41	VTMR	VIVYKLF	DEC	SL - -	DVKK	PLLPLAH	GDPSV	YPCYRTS	97
		120	130	140	150	160	170			
<i>L. infantum</i>	109	YPTV	GADNL	RQVVSTY	WRRFCQTKS	RQEAL	KWENVI	ITSGV	SQAIVL	167
<i>H. sapiens</i>	109	YAPS	IGFLSS	REEIASYYH	- - - - -	CPEAP	LEAKD	VILTS	SGCSQAID	161
<i>M. musculus</i>	109	YAPS	IGFLSS	REEIASYYH	- - - - -	CPEAP	LEAKD	VILTS	SGCSQAID	161
<i>C. elegans</i>	112	YGPA	VGALAA	REAI	VERYSS	- - - - -	SADNV	F	TADDV	164
<i>A. thaliana</i>	98	YGPA	AGIL	LPARQ	AVADY	VNRD - - - -	LTNK	VKPN	DVFI	151
		180	190	200	210	220	230			
<i>L. infantum</i>	168	ILVCA	PSFPH	YKSV	CDSY	GIECRY	YYLD -	PSK	SWEC	225
<i>H. sapiens</i>	162	ILVPR	PGFSL	YKTL	AESMG	IEVKLY	NNLL -	PEK	SWEI	219
<i>M. musculus</i>	162	ILVPR	PGFSL	YKTL	AESMG	IEVKLY	NNLL -	PEK	SWEI	219
<i>C. elegans</i>	165	ILVPH	PGFPL	YSTL	CRPHN	IVDK	PKYKID	MTGED	VRI	223
<i>A. thaliana</i>	152	ILVPR	PSYPH	Y	EARAV	YSGL	EV	RKFD	LL -	209
		240	250	260	270	280	290			
<i>L. infantum</i>	226	PCGS	NFSRAH	VSDI	IDFC	QQHQI	PLIS	DE	IYA	284
<i>H. sapiens</i>	220	PCGS	VFSKRHL	QKIL	AVAA	RQCVP	ILADE	IYG	DMVFS	278
<i>M. musculus</i>	220	PCGS	VFSKRHL	QKIL	AVAA	RQCVP	ILADE	IYG	DMVFS	278
<i>C. elegans</i>	224	PTG	GVFTKEH	LEE	ILAF	AHQYKL	IIIADE	IYG	DLVY	282
<i>A. thaliana</i>	210	PCGN	VYSYDHL	KKVA	ETAK	KL	GIMV	ITDE	IY	268
		300	310	320	330	340	350			
<i>L. infantum</i>	285	AKYQ	VCPGW	R	VGS	ILID	PMNVA -	GDWAV	GMER	338
<i>H. sapiens</i>	279	AKRW	LVP	GWRL	GWIL	IHDR	RDIF	GN	EIRD	333
<i>M. musculus</i>	279	AKRW	LVP	GWRL	GWIL	IHDR	RDIF	GN	EIRD	333
<i>C. elegans</i>	283	AKRW	MVPGW	R	LGWL	I	IHNH	FGVL -	TDVKN	336
<i>A. thaliana</i>	269	SKG	WIV	PGW	R	IGW	I	ALND	PRGIL	324
		360	370	380	390	400	410			
<i>L. infantum</i>	339	CPT	E	CTEH	IVTQ	LEAG	AKVYARL	LEH	DIGIS -	396
<i>H. sapiens</i>	334	TPGE	FYHNT	LS	FLKS	NADLC	YGALAA	IPGLR -	PVRPS	391
<i>M. musculus</i>	334	TPGE	FYHNT	LS	FLKS	NADLC	YGALAA	IPGLR -	PVRPS	391
<i>C. elegans</i>	337	TPED	YFVY	TRN	VIET	NANIV	DSIL	ADVP	GMR -	391
<i>A. thaliana</i>	325	ANKE	L	FAKK	N	SMLK	Q	NVEL	VCDRL	383
		420	430	440	450	460	470			
<i>L. infantum</i>	397	FYEK	L	LDE	EN	VQVLP	G	E	IFGMS	448
<i>H. sapiens</i>	392	FTER	L	VAEQ	SVH	CLPAT	CFEY	PNFI	R	450
<i>M. musculus</i>	392	FTER	L	VAEQ	SVH	CLPAT	CFEY	PNFI	R	450
<i>C. elegans</i>	392	FCQN	L	IRE	ESV	FCLP	GQAF	S	APGYF	450
<i>A. thaliana</i>	384	FCMK	L	AKE	EN	LVLL	PGVAL	G	LKNWI	442
		480								
<i>L. infantum</i>		- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	
<i>H. sapiens</i>	451	E	C	D	K	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	454
<i>M. musculus</i>	451	E	C	D	K	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	454
<i>C. elegans</i>	451	S	S	D	E	G	L	D	L	464
<i>A. thaliana</i>	443	A	L	S	N	G	K	I	- - - -	449

Figura 13. Alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos de la proteína LiTAT frente a sus ortólogos en *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Caenorhabditis elegans* y *Arabidopsis thaliana*. El sombreado en azul indica el grado de conservación entre las secuencias alineadas (a mayor intensidad de azul mayor es el grado de conservación). El residuo de lisina que participa en la unión covalente con la coenzima PLP en todas las aminotransferasas se destaca en rojo. En verde se señalan los residuos descritos que participan en la estabilización del coenzima. Los aminoácidos implicados en la unión y especificidad del enzima por los sustratos α -oxoácidos se señalan en amarillo.

4.1.2. Clonaje, expresión y purificación de LiTAT en condiciones nativas.

El estudio de la proteína con y sin el extremo N-terminal de 38 aminoácidos específico del género *Leishmania* (ver apartado 4.1.1.) resultaba interesante para poder identificar la posible función de dicho extremo (ver apartado 4.2.3.). Por tanto, la secuencia del gen LinJ36.2490 fue clonada completa (1347 pb) (LiTAT) y truncada sin los primeros 114 nucleótidos (1233 pb) (LiTAT_Tr) en el vector de expresión pRSET-A, incluyendo

la secuencia codificante de seis histidinas en el extremo 5' de la secuencia del gen en cuestión (extremo N-terminal de la proteína codificada). A continuación, se llevó a cabo la expresión en células de la estirpe BL21 de *E. coli*. Tras la inducción de la expresión, según las condiciones descritas previamente (apartado 3.5.3.1.), se observó en ambos casos la aparición de una banda coincidente con el peso molecular esperado de las proteínas recombinantes LiTAT (53.7 kDa) y LiTAT_Tr (49.7 kDa) (Figura 14). La fracción mayoritaria de ambas se encontraba en forma insoluble. Sin embargo, se observó cantidad suficiente de proteína soluble como para ser purificada en condiciones nativas. Ambas proteínas recombinantes se purificaron por cromatografía de afinidad en columna Ni-NTA inmovilizada en lecho de agarosa y cromatografía de exclusión molecular secuencialmente siguiendo el procedimiento especificado anteriormente (apartado 3.5.3.2.).

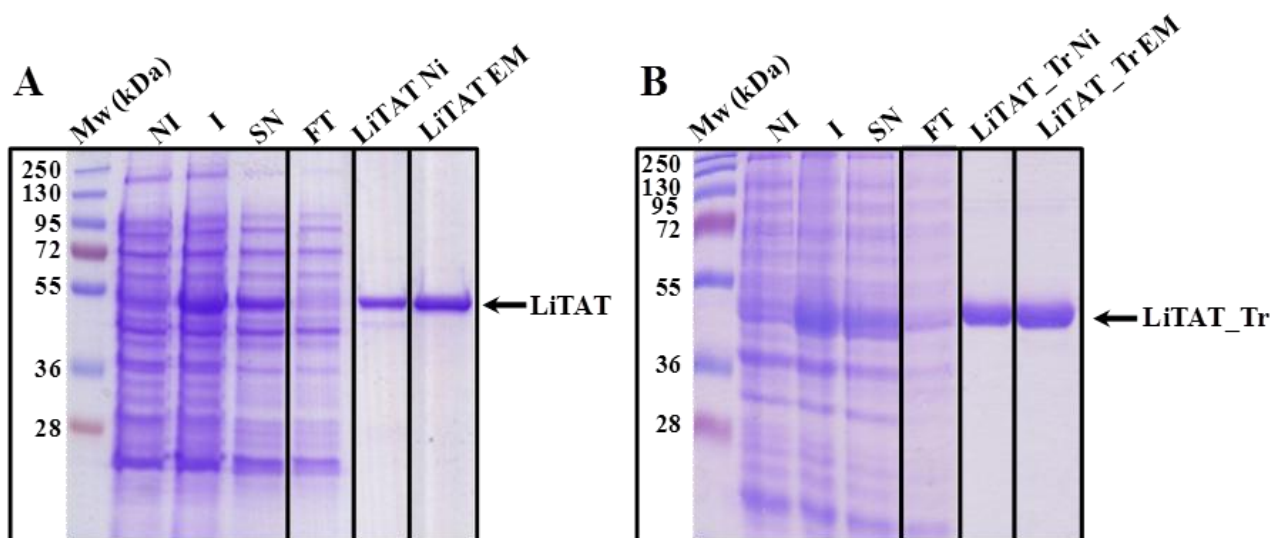


Figura 14. Expresión y purificación de LiTAT (A) y LiTAT_Tr (B) analizada por SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie. Mw: marcador de pesos moleculares; NI: control no inducido; I: control inducido; SN: extractos proteicos correspondientes a la fracción soluble tras la lisis celular; FT: fracción de proteínas no unidas a la columna con níquel; LiTAT Ni y LiTAT_Tr Ni: proteínas purificadas por cromatografía de afinidad con níquel; LiTAT EM y LiTAT_Tr EM: proteínas purificadas por cromatografía de exclusión molecular a partir de la fracciones resultantes de las purificaciones por cromatografía de afinidad.

El rendimiento final fue de 4,3 mg de proteína purificada/L de cultivo en el caso de LiTAT y de 5,1 mg de proteína purificada/L de cultivo en el caso de LiTAT_Tr.

La evaluación de las posibles formas oligoméricas de las proteínas LiTAT y LiTAT_Tr purificadas y en solución se llevó a cabo por dos métodos. Por un lado, mediante el cálculo del coeficiente de distribución (K_{av}) a partir del volumen de elución (V_e) de las proteínas nativas obtenido durante la purificación por cromatografía de exclusión molecular (apartado 3.5.4.), y por otro lado, mediante la estimación de la movilidad electroforética en gel de poliacrilamida en condiciones nativas (apartado 3.4.5.).

La columna de cromatografía de exclusión molecular fue calibrada con cinco patrones de distintos pesos moleculares con K_{av} conocido (Figura 15A). Los cromatogramas correspondientes a las proteínas purificadas son muy similares, con un pico mayoritario cuyo V_e es de 140 ml aproximadamente (Figuras 15B y 15C). La K_{av} calculada para esta fracción mayoritaria en la purificación de LiTAT es 0,1095, y el peso molecular estimado por cromatografía de exclusión molecular (M_r) de 115,6 kDa. Los datos de LiTAT_Tr son $K_{av} = 0,136$ y $M_r = 100,4$ kDa. En ambos casos el M_r es aproximadamente dos veces el M_w teórico (53,7 kDa para LiTAT y 49,7 kDa para LiTAT_Tr). Por lo tanto, la fracción mayoritaria representa la forma dimérica en ambos cromatogramas. Además de ésta, y también en ambos casos, aparece otra fracción minoritaria con un peso molecular estimado de 214 kDa.

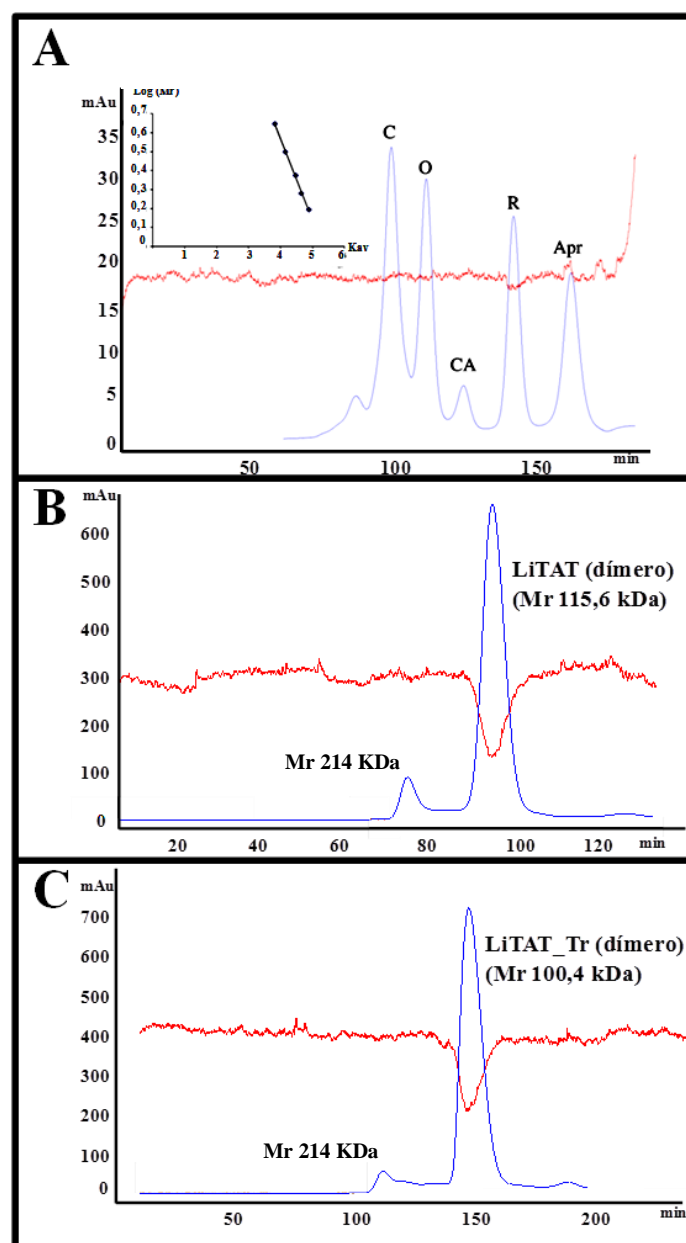


Figura 15 Análisis de las formas oligoméricas en solución de LiTAT y LiTAT_Tr en solución mediante la estimación de la movilidad electroforética. En azul se indica la absorción a 280 nm y en rojo la conductividad. (A) Curva de calibración: obtenida calculando el coeficiente de distribución (K_{av}) y el log del peso molecular de cinco proteínas estándar: Apr: aptrotina C: conalbúmina, CA: anhidrasa carbónica, O: ovoalbúmina, R: ribonucleasa. (B) y (C) cromatogramas correspondientes a las purificaciones por exclusión molecular de LiTAT y LiTAT_Tr respectivamente, a partir de las fracciones obtenidas de las purificaciones por cromatografía de afinidad. Se indica el peso molecular estimado (Mr) para cada oligómero.

Para identificar las fracciones correspondientes a las proteínas de interés en la cromatografía de exclusión molecular, se analizaron mediante electroforesis en condiciones nativas dos fracciones de la purificación de LiTAT correspondientes a los picos de Mr = 115,6 kDa y Mr = 214 kDa y dos fracciones de la purificación de LiTAT_Tr de los picos de Mr = 100,4 kDa y Mr = 214 kDa. Como se aprecia en la Figura 16, se identificaron dos moléculas mayoritarias en las fracciones con Mr = 100,4 kDa y Mr = 115,6 kDa, una dimérica la cual resultó ser mayoritaria, y otra correspondiente al monómero resultante de la desdimerización. También se comprobó que las fracciones con un Mr = 214 kDa no se correspondía con ningún oligómero de LiTAT o LiTAT_Tr ya que no se detectó ninguna señal por *Western blot* con el anticuerpo anti-6xHis (Anexo II). Por lo tanto, se descartaron estas fracciones, no considerándose como formas oligoméricas de LiTAT_Tr

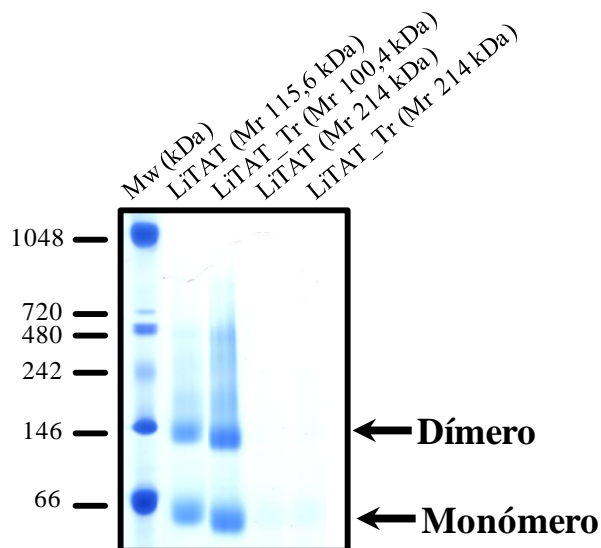


Figura 16. Análisis de las formas oligoméricas en solución de LiTAT y LiTAT_Tr por electroforesis en condiciones nativas y tinción por *Coomassie*. Análisis por PAGE 3-12% en condiciones nativas de las fracciones resultantes de la purificación por exclusión molecular de LiTAT y LiTAT_Tr. Los pesos moleculares estimados correspondientes a cada una de las fracciones se indican entre paréntesis.

4.1.3. Estabilidad de LiTAT y LiTAT_Tr en función de la temperatura.

Para evaluar el posible efecto que podía tener la ausencia del extremo N-terminal en la estabilidad de la proteína nativa se calculó la temperatura de desnaturalización de LiTAT y LiTAT_Tr mediante DSF (apartado 3.7.5.). Ésta resultó ser aproximadamente de 61 °C en ambos casos (Figura 17). Por tanto, aparentemente la estabilidad térmica de LiTAT no se ve alterada con la delección del extremo N-terminal.

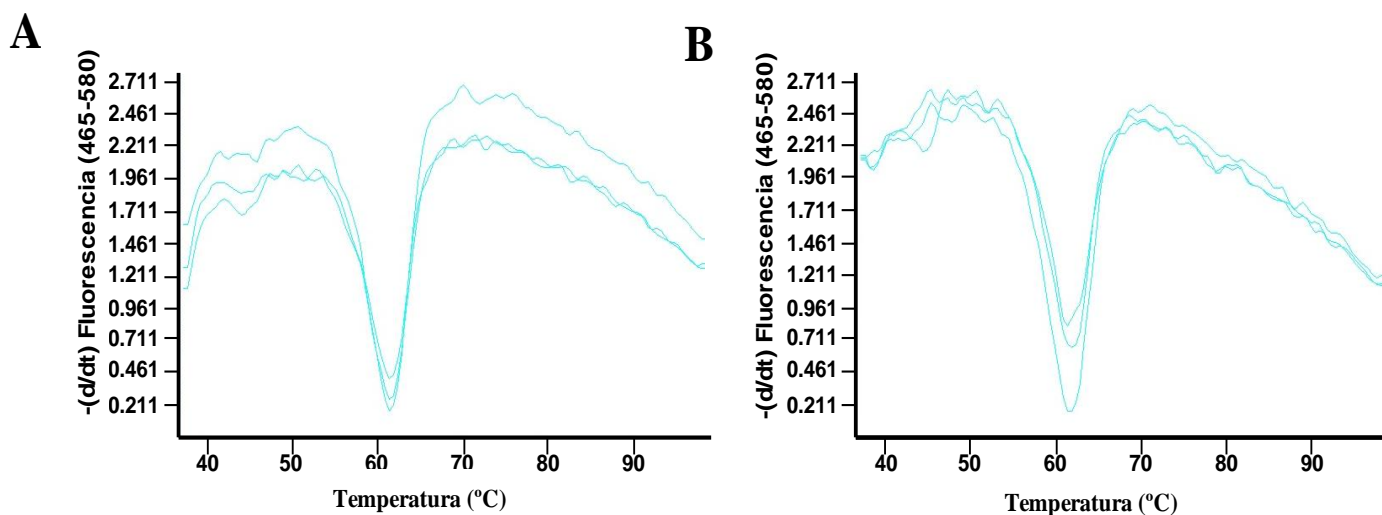


Figura 17. Temperatura de desnaturalización (T_m) de LiTAT (A) y de LiTAT_Tr (B) calculada mediante DSF. Se realizaron 3 réplicas técnicas por ensayo.

4.2. Expresión y regulación de LiTAT en el ciclo biológico de *L. infantum*.

4.2.1. Expresión de TAT en promastigotes.

La expresión de LiTAT en las distintas fases del ciclo biológico de *L. infantum* se evaluó en extractos de proteínas del parásito mediante *Western blot* utilizando un anticuerpo policlonal frente a la secuencia completa de LiTAT. Se analizó la expresión relativa de LiTAT estimada según se ha descrito en el apartado 3.4.2., en las distintas fases de crecimiento de los cultivos realizados: fase logarítmica temprana (día 1), fase logarítmica media (día 2), fase logarítmica tardía (día 3) y fase estacionaria (día 4). Como se puede ver en la figura 18A, con las condiciones ensayadas, sólo se pudo detectar expresión de LiTAT en promastigotes en fase logarítmica temprana. A partir de la fase logarítmica media, LiTAT es indetectable.

El anticuerpo policlonal frente a LiTAT presenta reactividad cruzada frente a la proteína ortóloga de *L. donovani*. A diferencia de lo que sucede en *L. infantum*, la expresión de TAT en promastigotes en cultivo de *L. donovani* se mantiene en las distintas fases de crecimiento aunque existe una disminución en los niveles de expresión conforme aumenta la densidad celular del cultivo (Figura 18B). Además, en fase logarítmica temprana la expresión normalizada de la proteína TAT es aproximadamente cuatro veces superior en *L. donovani*.

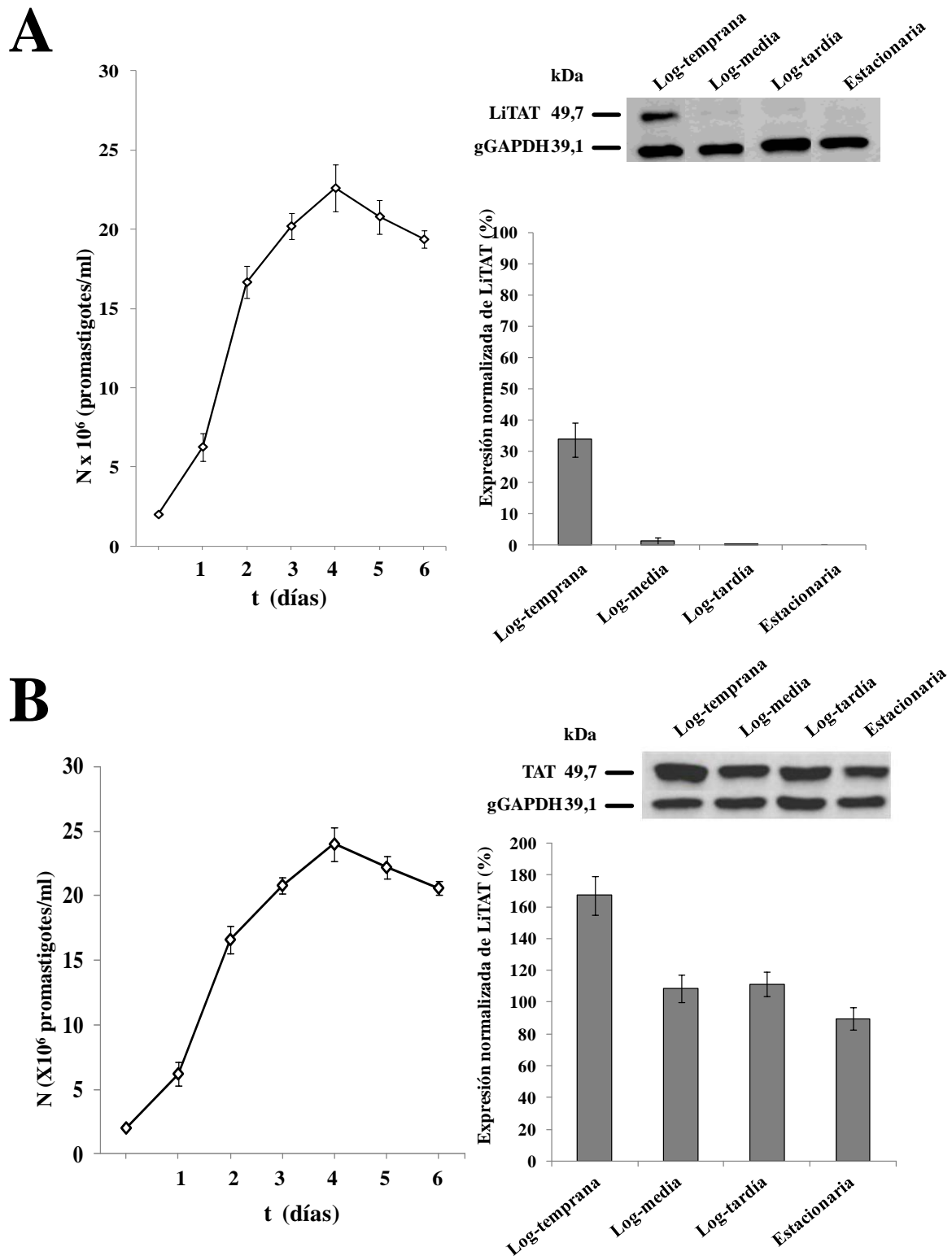


Figura 18. Expresión relativa de LiTAT en promastigotes de *L. infantum* y *L. donovani* en cultivo. (A) Curva de crecimiento medio de los promastigotes de *L. infantum* y análisis por *Western blot* de la expresión de LiTAT en las distintas fases de la curva crecimiento. (B) Curva de crecimiento medio de los promastigotes de *L. donovani* y análisis por *Western blot* de la expresión de TAT en las distintas fases de la curva crecimiento. Log-temprana: fase logarítmica temprana (día 1); Log-media: fase logarítmica media (día 2); Log-tardía: fase logarítmica tardía (día 3); Estacionaria: fase estacionaria (día 4). Se utilizaron como anticuerpos primarios, los policlonales anti-LiTAT (dilución 1:2.000) y anti-gGAPDH (dilución 1:10.000). Los niveles de expresión de LiTAT fueron normalizados frente a la expresión constitutiva del control de carga gGAPDH. En los histogramas se representan la media \pm SD de la expresión normalizada de LiTAT de tres réplicas biológicas.

4.2.2. Expresión de LiTAT en las formas infectivas de *L. infantum*.

Se analizó la expresión de la proteína LiTAT en promastigotes metacíclicos de *L. infantum* aislados de cultivo y en amastigotes axénicos e intracelulares.

La separación de los promastigotes procíclicos y metacíclicos se realizó a partir de un cultivo de promastigotes en fase estacionaria por dos métodos diferentes previamente descritos. En primer lugar se aislaron los promastigotes más infectivos o metacíclicos mediante aglutinación con PNA (apartado 3.2.3.3.). Los promastigotes no aglutinantes (PNA⁻) constituían alrededor del 1% de la población total en fase estacionaria. Los niveles de expresión de LiTAT en esta subpoblación son superiores a los observados en la subpoblación PNA⁺ (Figura 19B). No obstante, en ambos casos la expresión de LiTAT es muy inferior a la detectada previamente en promastigotes en fase logarítmica-temprana (Figura 18). El segundo método para la separación de los promastigotes metacíclicos, fue utilizando un gradiente de densidad de Percoll[®] (90-45-25%) (apartado 3.2.3.3.). El perfil de expresión de LiTAT en este caso es similar al mostrado en la separación con PNA, habiendo una mayor expresión de la proteína en la subpoblación metacíclica de promastigotes (promastigotes aislados de la interfase 45% - 95%), aunque menor a la detectada en fase logarítmica temprana.

A continuación se analizó la expresión de LiTAT en el estadio amastigote. Por un lado se cultivaron amastigotes axénicos a partir de un cultivo de promastigotes en fase estacionaria mediante un método previamente descrito (apartado 3.2.3.1.). Por otro lado, se estudió la expresión de la proteína LiTAT en amastigotes intracelulares aislados a partir de células U937 e infectadas *in vitro* (apartado 3.2.3.2.). Como se puede ver en la Figura 19, aunque existe expresión en ambos casos, ésta es muy superior en los amastigotes axénicos.

Por otro lado, se analizó la expresión de LiTAT en promastigotes de un aislado de perro de *L. infantum* (*chagasi*) resistente y de otro sensible a NO (apartado 3.1.2.). En este caso, en fase logarítmica temprana (día 1) la expresión normalizada es aproximadamente tres veces superior en los promastigotes resistentes a NO (Figura 20).

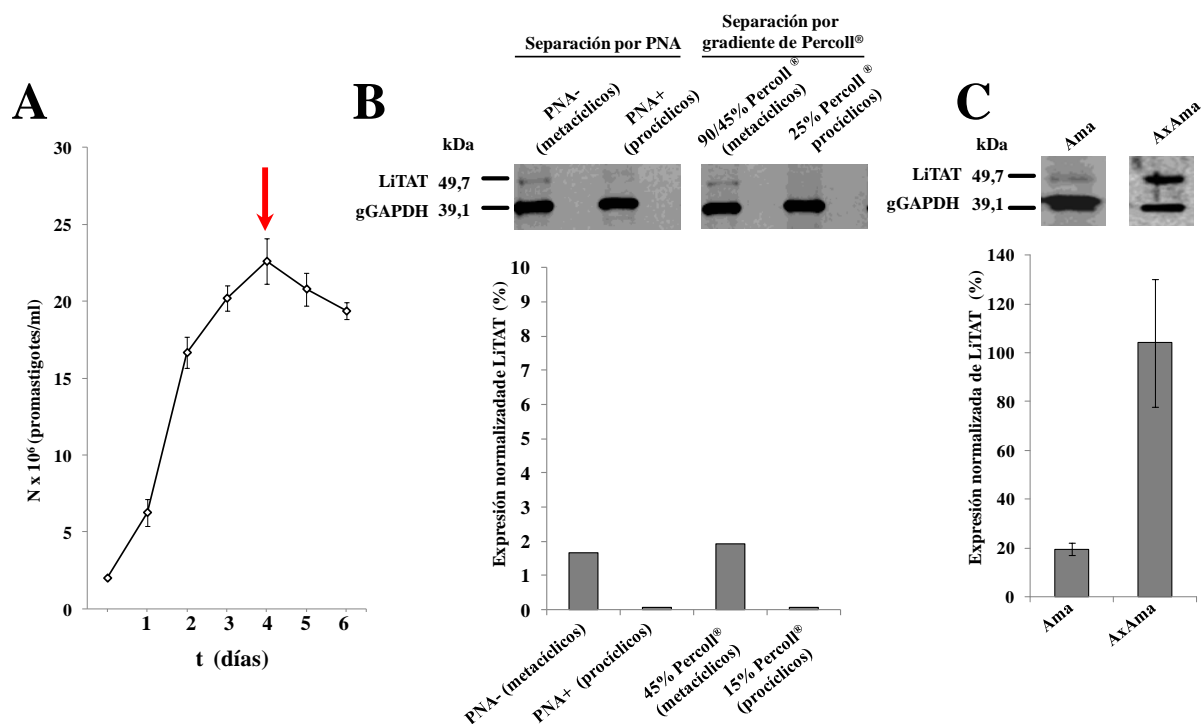


Figura 19. Expresión de LiTAT en las formas infectivas de *L. infantum*. (A) Curva de crecimiento medio de los promastigotes de *L. infantum*. A partir de promastigotes en fase estacionaria, indicada con una flecha roja (día 4), se aislaron los promastigotes metacíclicos y se subcultivaron los amastigotes intracelulares y axénicos. (B) Análisis por *Western blot* de la expresión de LiTAT en promastigotes metacíclicos aislados por aglutinación con PNA y gradiente de Percoll® (90-45-25%). (C) Análisis por *Western blot* de la expresión de LiTAT en amastigotes intracelulares aislados de células U-937 infectadas (Ama) y amastigotes axénicos (AxAma). Los niveles de expresión de LiTAT fueron normalizados frente a la expresión constitutiva del control de carga gGAPDH. En los histogramas se representan la media \pm SD de la expresión normalizada de LiTAT de tres réplicas biológicas independientes.

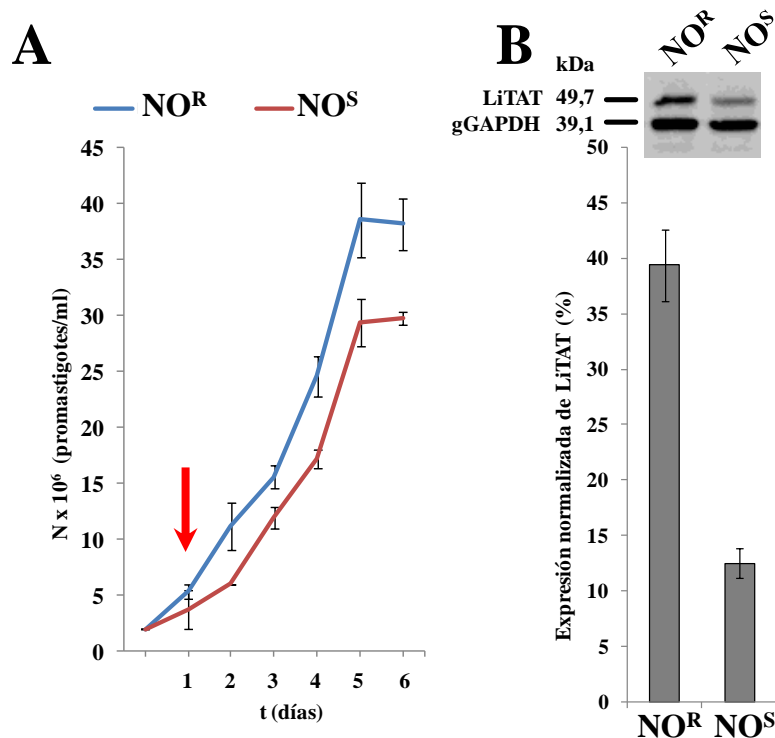


Figura 20. Análisis de la expresión de LiTAT en promastigotes de *L. infantum* (*chagasi*) resistentes a óxido nítrico (NO). (A) Curva de crecimiento medio de los promastigotes de *L. chagasi*. (B) Se analizó la expresión de LiTAT por *Western blot* en la fase logarítmica temprana a día 1 (flecha roja en A). NO^S: Cepa sensible a NO; NO^R: Cepa resistente a NO. Los niveles de expresión de LiTAT fueron normalizados frente a la expresión constitutiva del control de carga gGAPDH. En los diagramas de barras se representan la media \pm SD de la expresión normalizada de LiTAT de tres réplicas biológicas independientes.

4.2.3. Función del extremo N-terminal en la degradación de la proteína LiTAT.

La delección del extremo N-terminal de 38 aminoácidos y 4,3 kDa de LiTAT no conlleva cambios en la actividad enzimática de la proteína como se indica más adelante (apartados 4.4.1. y 4.4.2.). Asimismo, éste no participa en la dimerización de la proteína o en la estabilidad (apartado 4.1.2.). Por ello, se evaluó la posible implicación de dicho fragmento en la regulación de la expresión de LiTAT mediante la generación de dos líneas *knock-in* de LiTAT y LiTAT_Tr utilizando el vector pIR de sobre-expresión en tripanosomátidos (pIR-LiTAT y pIR-LiTAT_Tr) mediante su selección con nourseotricina. La DL50 de los promastigotes de *L. infantum* wild-type con nourseotricina calculada fue de 78,97 µg/ml (Anexo III).

El crecimiento de los promastigotes, subcultivados en medio completo a partir de un cultivo en fase estacionaria, no se ve afectado por la sobre-expresión de LiTAT o de LiTAT_Tr y las fases de crecimiento logarítmica media y estacionaria se alcanzan de manera similar a como sucede en los cultivos control (Figura 21A). Se obtuvieron extractos proteicos cada 24 horas desde el inicio de la curva de crecimiento y se cuantificó por *Western blot* la expresión normalizada de LiTAT en cada línea celular (Figura 21B). En fase logarítmica temprana (día 1) los promastigotes de las líneas *knock-in* sobre-expresan LiTAT y LiTAT_Tr aproximadamente tres y cuatro veces más respectivamente con respecto a la línea de promastigotes control, transfectada únicamente con el vector pIR. En fase logarítmica-media (día 2), no se detectó LiTAT en promastigotes control, mientras que en los promastigotes de la línea pIR-LiTAT, la expresión normalizada se reducía a la mitad aproximadamente. Por otro lado, en el caso de pIR-LiTAT_Tr aunque existía una disminución de la expresión, esta era menor que la observada en la línea pIR-LiTAT. En fase logarítmica tardía (día 3), no se pudo detectar expresión de LiTAT en promastigotes de las líneas pIR y pIR-LiTAT. Sin embargo, en esta fase de crecimiento, los promastigotes de la línea LiTAT_Tr seguían expresando la proteína truncada aunque nuevamente disminuía su expresión. Una vez alcanzada la fase estacionaria, mientras que en las líneas pIR y pIR-LiTAT seguía sin observarse expresión de LiTAT, en la línea pIR-LiTAT_Tr existía una disminución diaria del 20% en el nivel de expresión relativa hasta que se alcanzaba la fase de la muerte celular (día 8).

Por tanto, la delección del extremo N-terminal de LiTAT evita parcialmente la degradación de la proteína a lo largo de la curva de crecimiento.

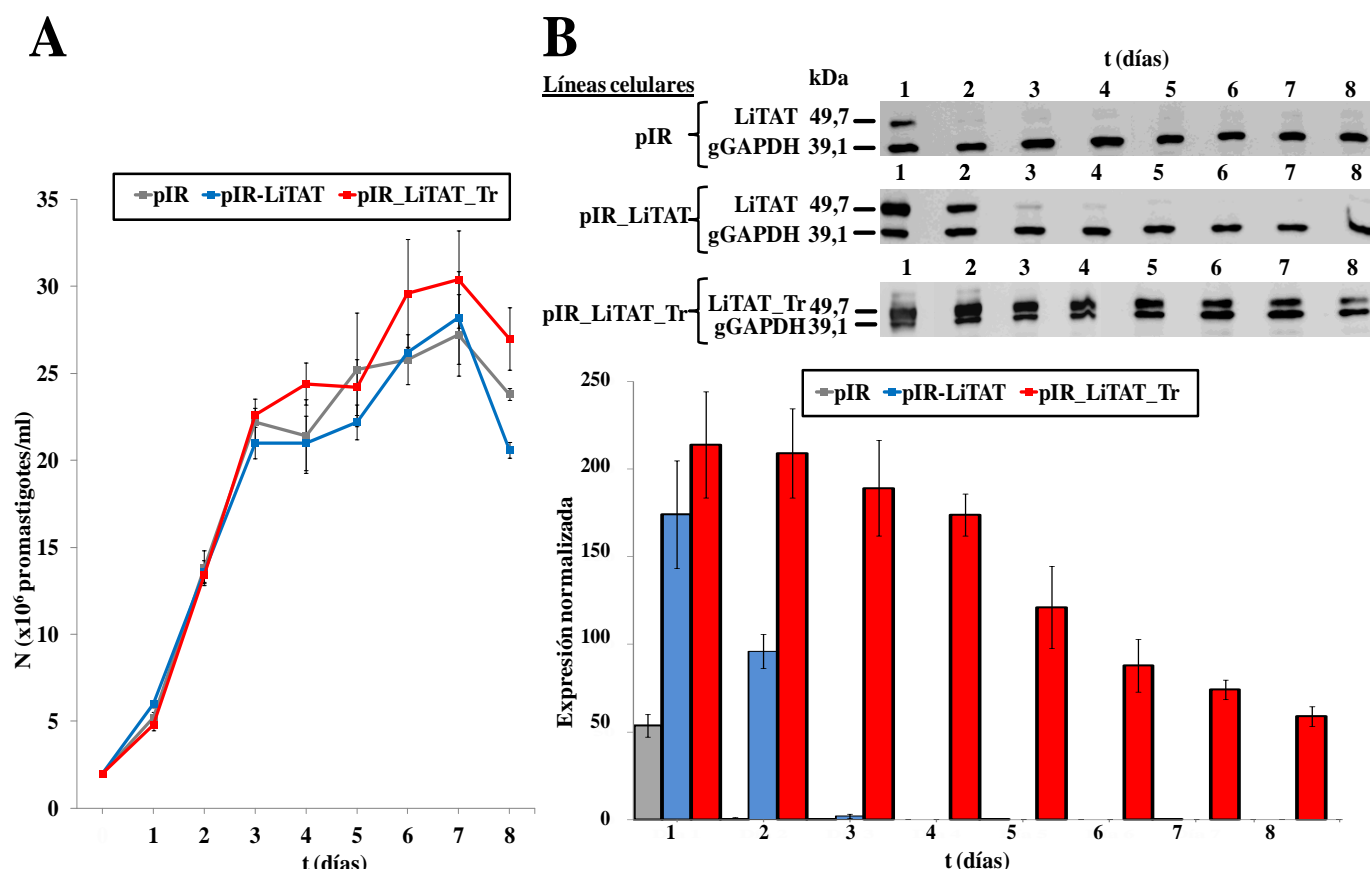


Figura 21. Niveles de expresión de LiTAT y LiTAT_Tr en la curva de crecimiento de promastigotes de líneas transfectantes estables de sobre-expresión de ambas proteínas. (A) Curva de crecimiento de promastigotes de *L. infantum* transfectados con el vector (pIR) (en gris) y de las líneas celulares *knock-in* pIR-LiTAT (en azul) y pIR-LiTAT_Tr (en rojo). N es la densidad celular media de las tres replicas biológicas del experimento. (B) Perfil de expresión de LiTAT y LiTAT_Tr analizado por *Western blot* a lo largo de la curva de crecimiento. Los niveles de expresión de LiTAT y LiTAT_Tr fueron normalizados frente a la expresión constitutiva del control de carga gGAPDH. En los histogramas se representan la media \pm SD de la expresión normalizada de LiTAT y LiTAT_Tr de tres réplicas biológicas.

4.2.4. Expresión de LiTAT en presencia de MG-132.

Para estudiar si la degradación de LiTAT que se inicia en la fase logarítmica está mediada por el proteasoma, los cultivos de promastigotes se trataron con el inhibidor de la subunidad 26S del proteasoma Z-Leu-Leu-Leu-CHO (MG-132) (Listovsky y col., 2011, Perez-Pertejo y col., 2011) y se comparó la expresión del enzima con un cultivo control de promastigotes a las 24, 48 y 72 horas.

A las 48 h de cultivo el crecimiento de los promastigotes de *L. infantum* es dos veces inferior en presencia de MG-132. A partir de entonces se inicia la fase de muerte celular por toxicidad del inhibidor (Figura 22A). Por ello, se estimó la expresión normalizada de LiTAT hasta las 48 h. Mientras que a las 4 h de incubación con MG-132, la expresión de LiTAT es similar en ambos cultivos, a las 24 h, la expresión de LiTAT es mayor en el cultivo tratado con MG-132 (Figura 22B). A las 48 h no se detecta expresión de LiTAT en los promastigotes control, mientras que en los cultivos tratados con el inhibidor sí hay expresión aunque esta es inferior a la observada a las 24 h.

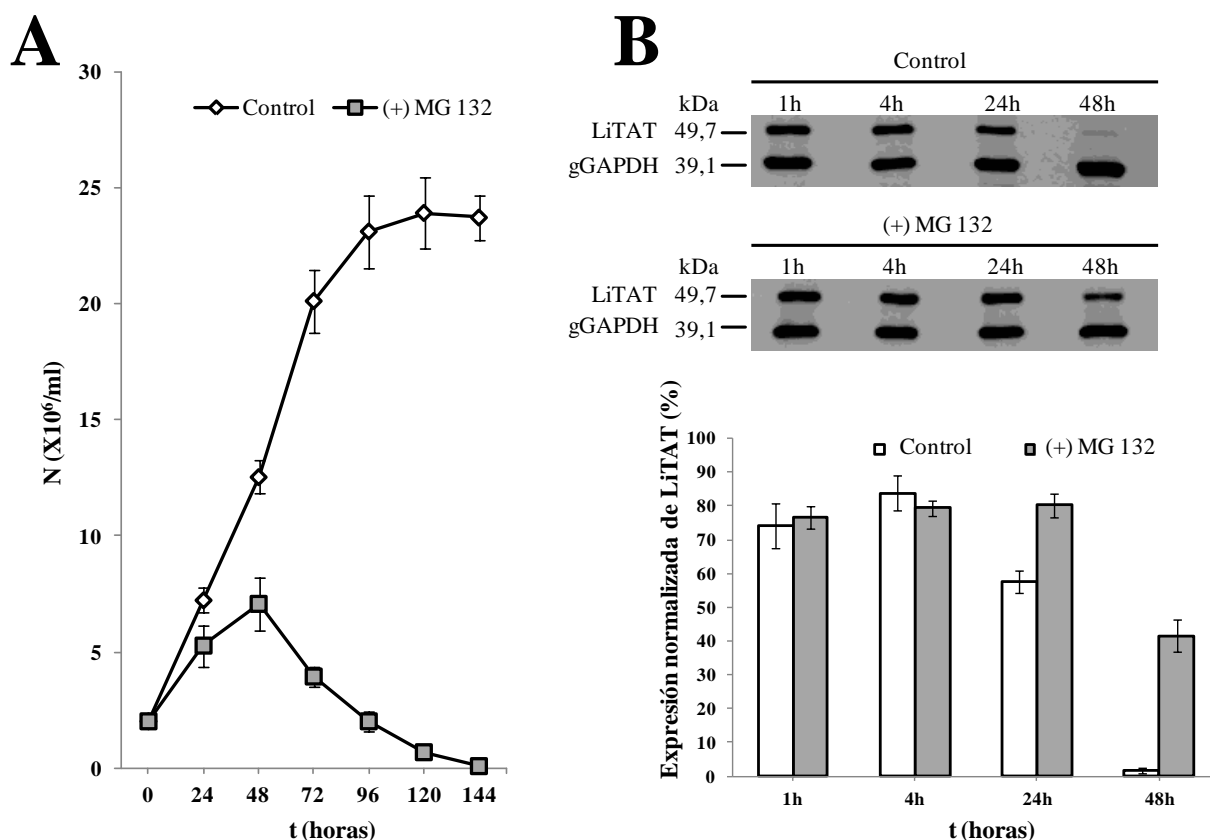


Figura 22. La degradación de LiTAT es sensible a la presencia del inhibidor de la subunidad 26S del proteasoma MG-132. (A) Curva de crecimiento medio de promastigotes control y tratados con el inhibidor del proteasoma MG-132. (B) Análisis por *Western blot* de la expresión normalizada de LiTAT en extractos totales de proteína de promastigotes de *L. infantum*. Los niveles de expresión de LiTAT fueron normalizados frente a la expresión constitutiva del control de carga gGAPDH. Cada valor representa la media \pm SD de tres réplicas biológicas independientes.

4.2.5. Influencia del suero bovino fetal (SBF) en la expresión de LiTAT en promastigotes de *L. infantum* en cultivo axénico.

4.2.5.1. Efecto de la suplementación con suero en la expresión de LiTAT.

A partir de un cultivo de promastigotes de *L. infantum* en fase estacionaria (día 6), en el cual no se detectaba LiTAT, se iniciaron nuevos cultivos con medio completo en los que se evaluó la expresión de LiTAT durante las primeras horas (Figura 23).

LiTAT se empieza a expresar a partir de las 2 h tras el inicio del cultivo y el nivel máximo de expresión se observaba entre las 4 y la 8 h. A partir de entonces, su expresión decae hasta no ser detectable a día 2.

A día 6 (en fase estacionaria), el medio de cultivo se suplementó con un 10% adicional de suero (SBF) y se evaluó el efecto que tenía esto sobre los parámetros de densidad celular en el cultivo y expresión normalizada de LiTAT. Por un lado se observó que a las 24 h desde la adición del SBF se producía un aumento aproximado del 50% en la densidad celular. A partir de entonces ésta disminuía alcanzándose a las 96 h los valores previos a la adición del suero. Por otro lado, transcurrida 1 h desde la suplementación con SBF en fase estacionaria, se volvía a detectar expresión de LiTAT. Además, y de modo similar a lo observado en el inicio del cultivo, la máxima expresión de LiTAT se alcanzaba a las 4 h aproximadamente aunque con mayores niveles de expresión. Transcurridas 24 h desde dicha suplementación, la expresión de LiTAT era mucho menor, aunque ésta se seguía

observando siendo prácticamente indetectable a las 48 h (Figura 23B). En resumen, partiendo de un preinóculo en fase estacionaria, tanto el medio completo fresco como la adición de suero en fase estacionaria inducen la expresión de LiTAT.

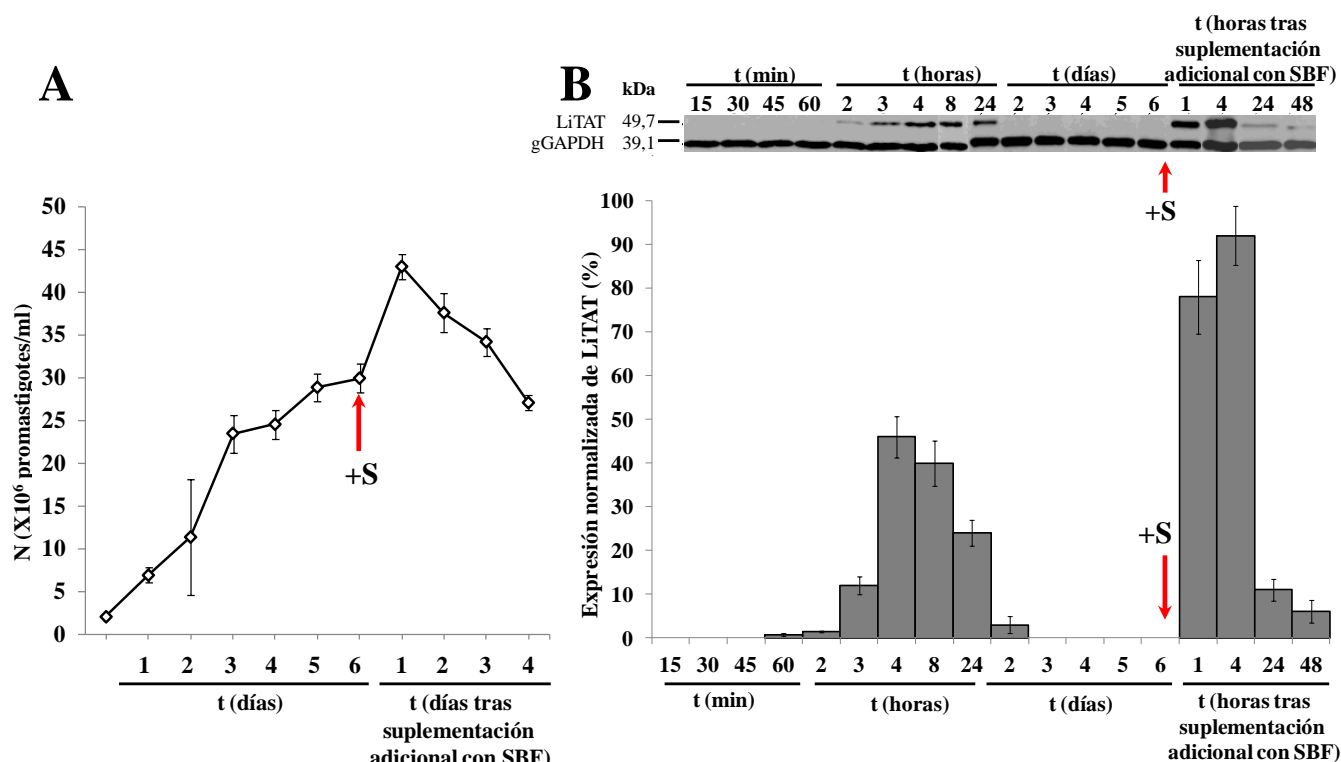


Figura 23. Efecto de la suplementación con SBF en la expresión de LiTAT. (A) Curva de crecimiento. N es la densidad celular media de las tres replicas biológicas del experimento. A día 6 se añadió un 10% adicional de SBF (indicado con una flecha roja). (B). Análisis por *Western blot* de la expresión normalizada de LiTAT. Los niveles de expresión de LiTAT fueron normalizados frente a la expresión constitutiva del control de carga gGAPDH. En el histograma se representan la media y la SD de los datos de tres réplicas biológicas independientes.

4.2.5.2. Efecto de la supresión del suero del medio de cultivo de promastigotes en la expresión de LiTAT.

Teniendo en cuenta lo anterior, el inicio de la expresión de LiTAT es dependiente de la presencia de suero en el medio de cultivo. Por ello, se evaluó la expresión de LiTAT en ausencia de SBF considerándose dos tipos de preinóculos diferentes para el inicio de los cultivos (Figuras 24 y 25). En el primer caso se utilizó como preinóculo un cultivo que se encontraba en fase logarítmica temprana (día 1) y en el que se había comprobado mediante *Western blot* que existía expresión de LiTAT (Figura 24A). En el segundo caso el preinóculo utilizado era un cultivo en fase estacionaria (día 6 en este caso) en el que no se había detectado expresión de LiTAT (Figura 25A). En ambas situaciones, en ausencia de suero en los cultivos, no se observó crecimiento de promastigotes.

Al subcultivar promastigotes en fase logarítmica temprana en medio RPMI sin SBF, la expresión de LiTAT, era muy alta y se mantuvo a lo largo de seis días (Figura 24B). Al añadir SBF al 10% en el día 6, la densidad celular aumentó de forma exponencial iniciando el cultivo la fase logarítmica de crecimiento (Figura 24A) y, por otro lado, se observó una disminución de la expresión de LiTAT a partir de la primera hora hasta la desaparición prácticamente total a las 48 h de la adición del suero.

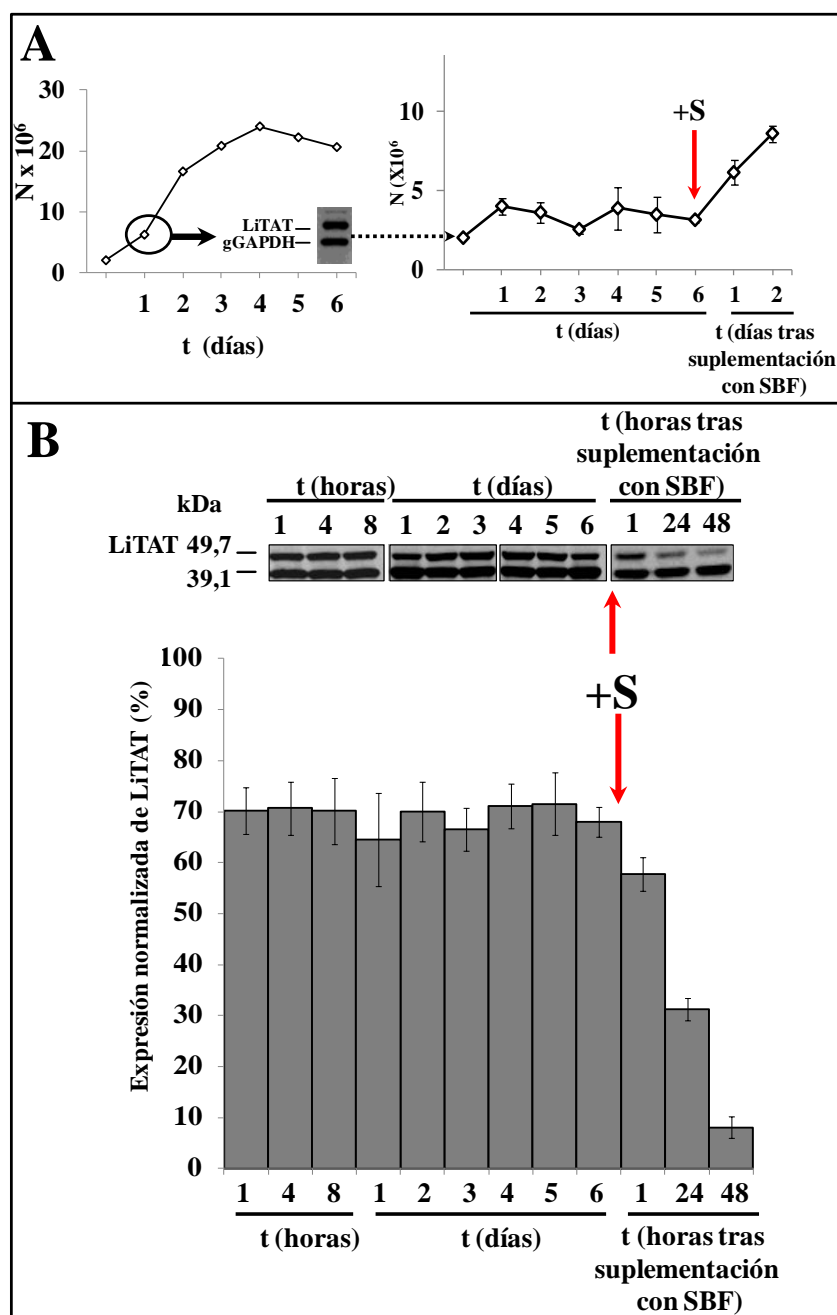


Figura 24. Perfil de expresión de LiTAT en ausencia de SBF en promastigotes subcultivados a partir de un cultivo en fase logarítmica temprana. (A) Curva de crecimiento medio de promastigotes de *L. infantum* en medio RPMI sin SBF, subcultivado a partir de un cultivo en medio completo en fase logarítmica temprana en el que LiTAT se expresa. Transcurridos seis días desde el inicio del cultivo en ausencia de suero, este añadió en un 10% a los cultivos (indicado con una flecha roja). N es la densidad celular media de las tres replicas biológicas del experimento. (B) Análisis por *Western blot* de la expresión de LiTAT en los promastigotes subcultivados en medio sin suero a partir de un cultivo en fase logarítmica temprana. Los niveles de expresión de LiTAT fueron normalizados frente a la expresión constitutiva del control de carga gGAPDH. En los histogramas se representa la media y la SD de los datos de tres réplicas biológicas.

Los promastigotes obtenidos de un cultivo en fase estacionaria y subcultivados en medio sin SBF, no eran capaces de expresar LiTAT (Figura 25B). Como en el caso anterior, tras seis días desde el inicio del cultivo, este se suplementó con un 10% de SBF y a las 24 h desde dicha adición, se comprobó que existía un aumento en el crecimiento de los promastigotes como en el caso anterior (Figura 25A) y nuevamente se detectó expresión de la proteína LiTAT. A las 48 h desde la adición del SBF, la expresión normalizada de LiTAT había disminuido un 90% aproximadamente.

Por tanto se puede concluir que al no añadir el suero en un nuevo medio de cultivo, no se observan cambios en la expresión de LiTAT. Además, la adición de SBF al cultivo de promastigotes sin suero induce tanto el inicio de la expresión de LiTAT como su degradación.

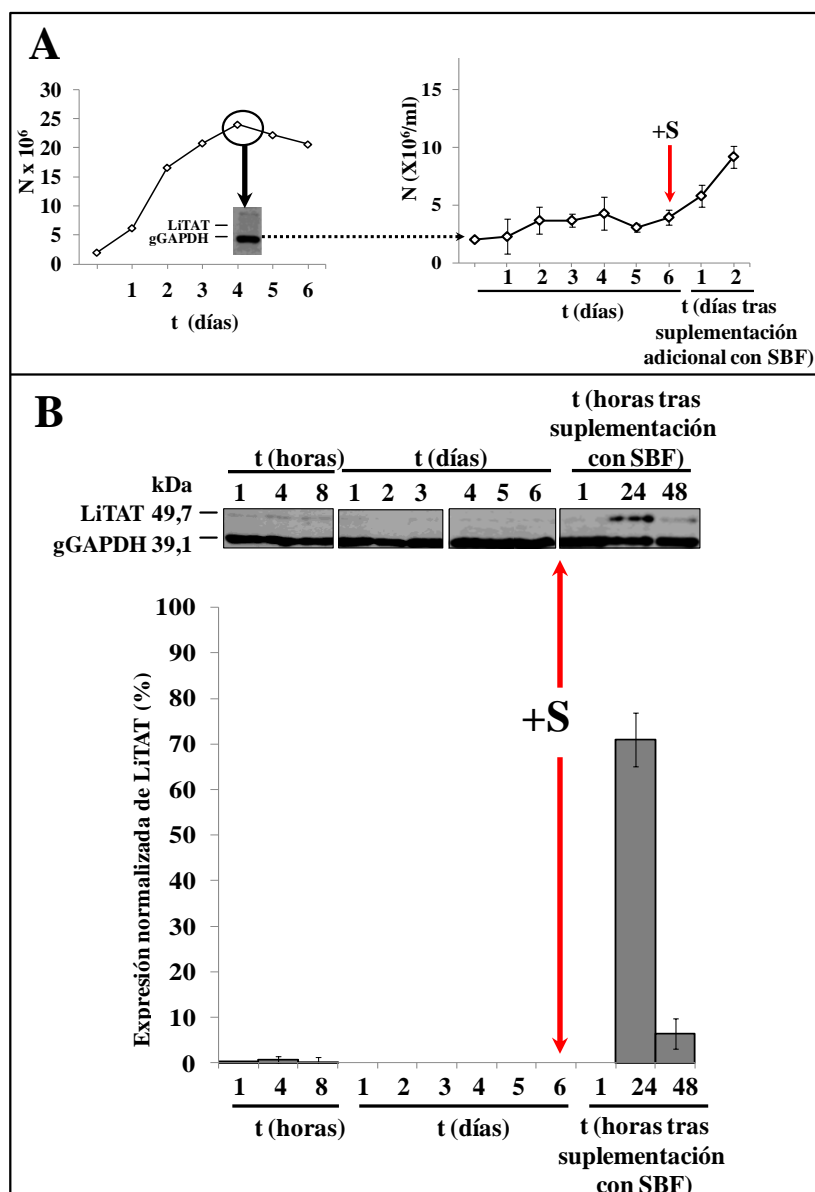


Figura 25. Perfil de expresión de LiTAT en ausencia de SBF en promastigotes subcultivados a partir de un cultivo en fase estacionaria. (A) Curva de crecimiento medio de promastigotes de *L. infantum* en medio RPMI sin SBF, subcultivado a partir de un cultivo en medio completo en fase estacionaria en el que LiTAT no se expresa. Transcurridos seis días desde el inicio del cultivo en ausencia de suero, se añadió un 10% de este a los cultivos (indicado con una flecha roja). N es la densidad celular media de las tres replicas biológicas del experimento. (B) Análisis por *Western blot* de la expresión de LiTAT en los promastigotes subcultivados en medio sin suero a partir de un cultivo en fase estacionaria. Los niveles de expresión de LiTAT fueron normalizados frente a la expresión constitutiva del control de carga gGAPDH. En los histogramas se representa la media y la SD de los datos de tres réplicas biológicas.

4.2.6. Estudio del efecto de la delección de nutrientes del medio de cultivo sobre la expresión de LiTAT.

Como se ha descrito en el apartado anterior, el SBF inicia tanto el crecimiento de los promastigotes en cultivo como la expresión de la proteína LiTAT. Por tanto, con el objetivo de estudiar cuál/es de los componentes presentes en el suero se necesita/n para iniciar la expresión de la proteína LiTAT se iniciaron nuevos cultivos con distintas condiciones nutricionales a partir de un mismo preinóculo de promastigotes en fase estacionaria.

En primer lugar, para averiguar la masa molecular de la/s molécula/s necesaria/s para el inicio de la expresión de LiTAT, se filtró el SBF en función de dicha masa y se obtuvieron tres sueros modificados: Suero 1, en el que se habían eliminado los componentes con una masa molecular superior a 100 kDa; Suero 2, sin aquellas moléculas con una masa molecular superior a 30 kDa; y Suero 3, en el que se habían eliminado los componentes de masa molecular superior a 10 kDa. Por otra parte, se eliminaron los componentes termolábiles del SBF mediante calentamiento a 95 °C (Suero 4), con el objetivo de estudiar el crecimiento y la expresión relativa de LiTAT sin dichos factores.

La eliminación de los componentes del suero de más de 30 kDa (Sueros 1 y 2) no afectó al crecimiento de los promastigotes en cultivo (Figura 26A). Por otro lado, al eliminar las macromoléculas de más de 10 kDa, sí se observó una disminución del crecimiento normal. Sin embargo, en ningún caso es necesaria la presencia de componentes con un peso molecular mayor de 10 kDa para la expresión de LiTAT, dado que su expresión a las 24 h se mantiene a pesar de la eliminación de estas moléculas. En todos los casos la expresión normalizada de LiTAT a las 48 h es inferior, a la que existe a las 24 h (Figura 26B). Por otro lado, al eliminar los compuestos termolábiles del SBF, el crecimiento de los promastigotes se reduce considerablemente y, aunque la expresión de LiTAT se mantiene, esta se encuentra muy reducida (Figura 26B).

Teniendo en cuenta lo anterior, el nutriente o los nutrientes necesario/s para iniciar la expresión de LiTAT tenía/n que ser termolábiles parcialmente y/o tener una masa molecular inferior a 10 kDa. Por tanto, se evaluó el efecto que podía tener la ausencia de algunos nutrientes que cumplían ambas condiciones o al menos una de las dos. Dado que el SBF es un medio complejo sin una composición definida de cada uno de los nutrientes necesarios para el cultivo de *Leishmania*, se utilizó un medio sin suero previamente descrito para el crecimiento de promastigotes y con concentración definida de cada uno de los componentes (*Complete Defined Medium/Leishmania Promastigotes* o CDM/LP) (Merlen y col., 1999) que permite cultivar promastigotes controlando qué nutrientes se incluyen en el medio de cultivo. La tabla con todos los nutrientes analizados y el perfil de expresión de LiTAT en ausencia de los mismos individualmente se encuentra en el Anexo IV. En primer lugar, se comprobó que el perfil de expresión de LiTAT en promastigotes en cultivo con todos los nutrientes descritos en el medio CDM/LP, y durante las primeras 48 h de cultivo, era similar al observado con el medio completo con SBF (Figura 26). Sin embargo, como se puede observar en la figura 26B, al no incluir hemina en el medio CDM/LP (medio CDM/LP [-Hemina]), la expresión de LiTAT era prácticamente indetectable y no se observaba crecimiento de los promastigotes en cultivo. En ausencia del resto de nutrientes analizados, la expresión de LiTAT era similar a la observada en promastigotes cultivados con medio completo, por lo que no son necesarios para iniciar la expresión de la proteína (Anexo IV). Por tanto, el hierro en su forma biodisponible como hemina, es necesario para iniciar la expresión de LiTAT en promastigotes de *L. infantum*.

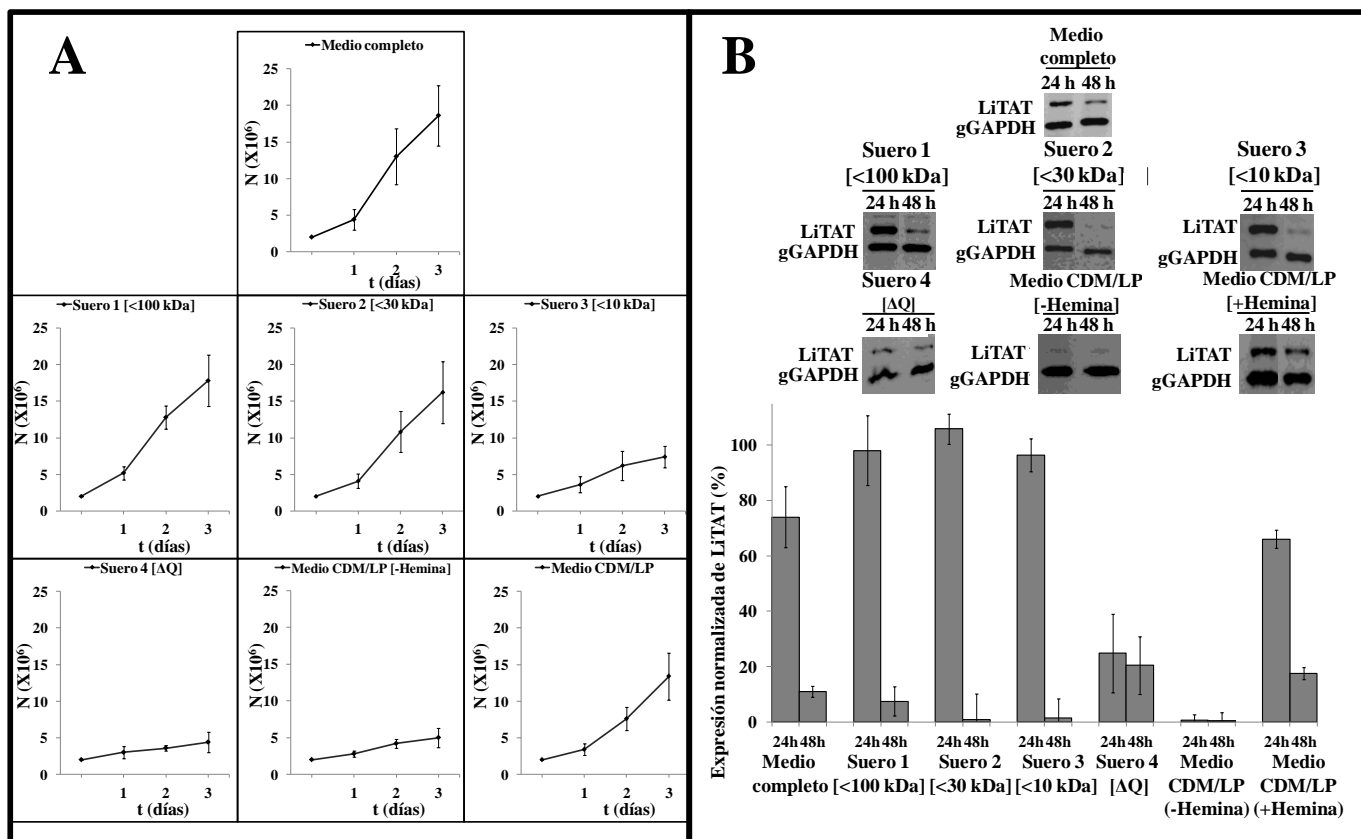


Figura 26. Evaluación de la expresión de LiTAT y del crecimiento de promastigotes al modificar la composición de nutrientes y otros factores del medio de cultivo (A) Curvas de crecimiento medias de los promastigotes de *L. infantum* en cultivo con los siguientes medios modificados: medio completo; Suero 1, medio de cultivo con 10% de SBF sin componentes de masa molecular mayor a 100 kDa; Suero 2, medio de cultivo con 10% de SBF sin componentes con Mw>30 kDa; Suero 3, Medio de cultivo con 10% de SBF sin macromoléculas con Mw>10 kDa; Suero 4, medio de cultivo con 10% de SBF sin sustancias termolábiles; medio CDM/LP [Hemina], medio completo definido con hemina; medio CDM/LP [-Hemina], medio completo definido sin hemina; N es la densidad celular media. (B) Análisis por Western blot de la expresión de LiTAT normalizada frente a gGAPDH, en promastigotes a las 24 y a las 48 h en los medios de cultivo mencionados previamente. Los histogramas representan la media \pm SD de la expresión relativa de LiTAT de tres réplicas biológicas independientes.

4.3. Localización subcelular de LiTAT.

La localización subcelular de LiTAT en promastigotes se evaluó en primer lugar mediante IFI (apartado 3.6.5.). Según los resultados obtenidos, la localización de la proteína LiTAT en promastigotes en fase logarítmica temprana es probablemente citoplasmática en acúmulos, en mayor medida cercanos a la membrana citoplasmática y al bolsillo flagelar (Figura 27). Además, no existe co-localización con el núcleo o el kinetoplasto del parásito. En promastigotes en fase estacionaria no se pudo detectar señal de fluorescencia verde manteniendo los mismos parámetros para la toma de imágenes. En promastigotes metacíclicos, la señal fluorescente verde no está distribuida por todo el citoplasma sino que parece estar circunscrita a un compartimento celular que parece co-localizar con la señal azul correspondiente al ADN.

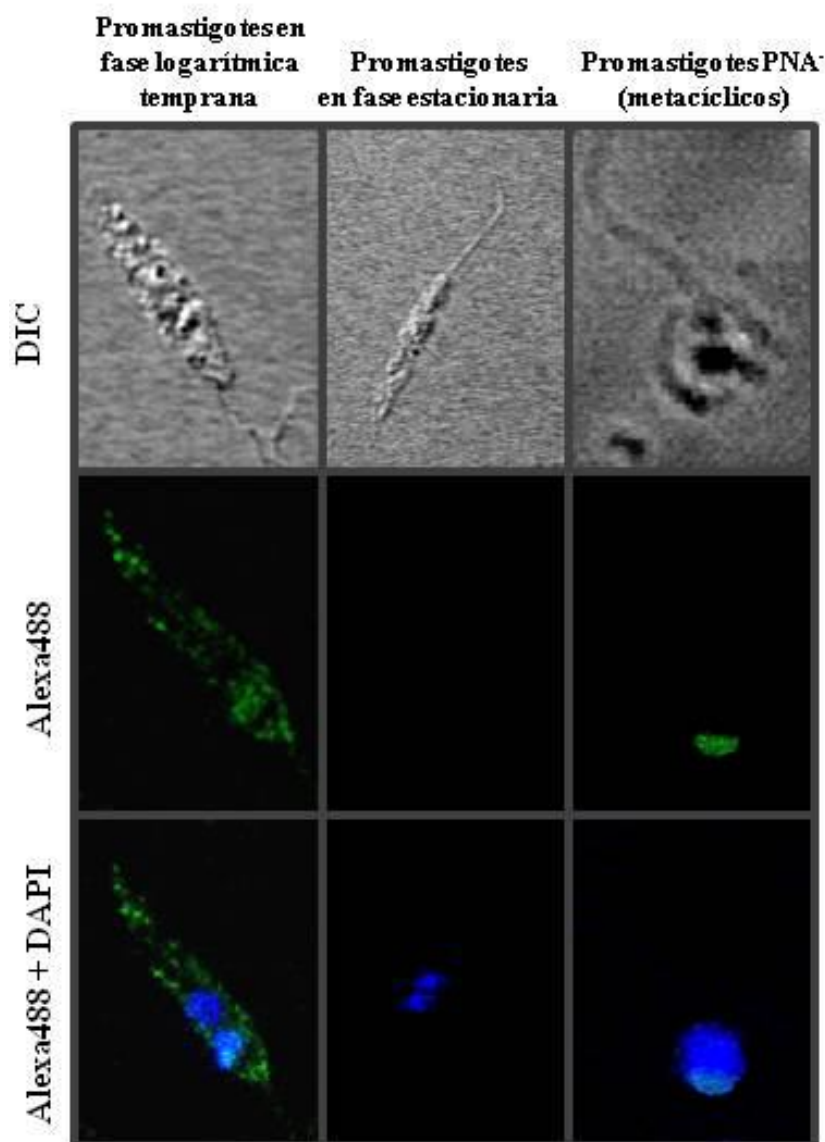


Figura 27. Análisis por IFI de la localización subcelular de LiTAT en promastigotes. DIC: Contraste interferencial. El anticuerpo primario anti-LiTAT se utilizó a una dilución 1:50. El anticuerpo secundario, conjugado al fluorocromo de emisión en verde Alexa488, se utilizó a una dilución 1:200. La fluorescencia azul corresponde al ADN celular (núcleo y kinetoplasto) marcado con DAPI. Las imágenes de fluorescencia que se muestran fueron tomadas por microscopía confocal y corresponden a la superposición de distintos planos.

Para confirmar la localización citoplasmática de LiTAT en promastigotes en fase logarítmica temprana, se realizó un gradiente con concentraciones crecientes de digitonina. Con este procedimiento se espera que las proteínas citosólicas se solubilizan con concentraciones bajas de digitonina, mientras que las proteínas compartimentalizadas requieren altas concentraciones del mismo para su completa solubilización. En este caso se comparó el patrón de solubilización con digitonina de LiTAT con el de la proteína glicosomal, gGAPDH. Como se observa en la Figura 28, la concentración de digitonina necesaria para solubilizar aproximadamente el 75% de la proteína gGAPDH (10 mg de digitonina/mg de proteína total) es 100 veces superior a la concentración necesaria para extraer el mismo porcentaje de la proteína LiTAT (0,1 mg de digitonina/mg de proteína total).

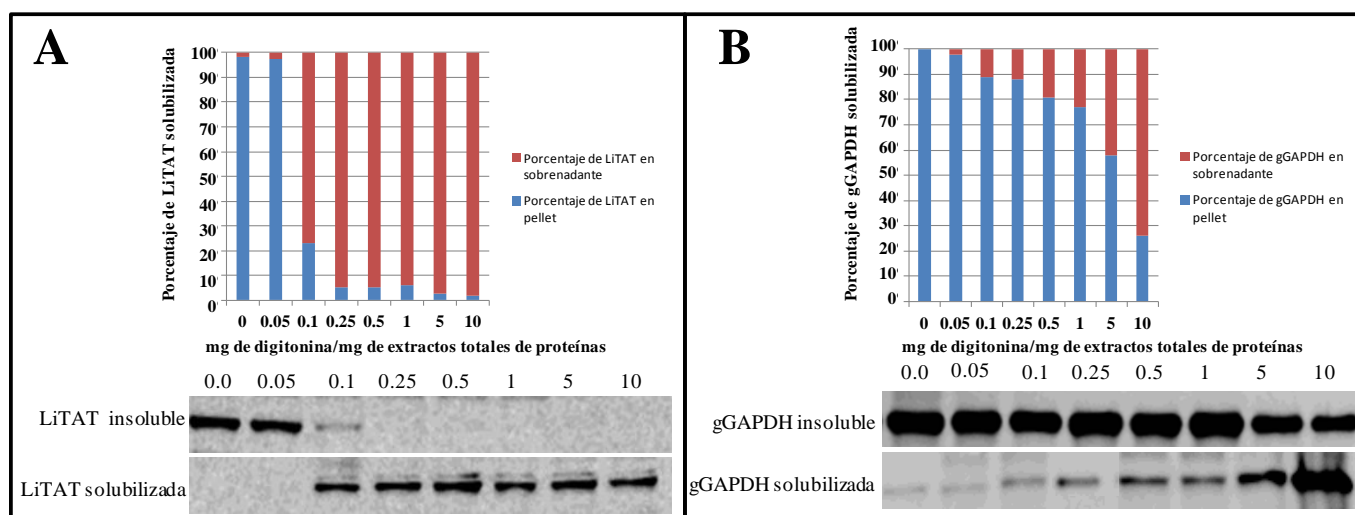


Figura 28. Análisis del patrón de solubilidad de LiTAT utilizando un gradiente de digitonina en promastigotes de *L. infantum*. (A) Análisis por *Western blot* del patrón de solubilización de LiTAT con digitonina. (B) Análisis por *Western blot* del patrón de solubilización con digitonina de la proteína compartimentalizada utilizada como control, gGAPDH.

4.4. Estudios de actividad enzimática.

4.4.1. Actividad enzimática específica de LiTAT y LiTAT_Tr frente a distintos oxoácidos.

La purificación en condiciones nativas (apartado 4.1.2.) permitió obtener una fracción homogénea con la que se desarrollaron los ensayos de actividad con cuatro α -oxoácidos distintos. La especificidad entre ambas proteínas recombinantes frente a los α -oxoácidos ensayados es muy similar (Tabla 6). Utilizando tirosina como aminoácido donador, ambas enzimas mostraron la mayor AEE utilizando piruvato. Ninguna de las dos proteínas recombinantes mostró actividad con los α -oxoácidos dicarboxílicos, α -cetoglutarato y oxalacetato, sin embargo sí que son capaces de transaminar cetometiltiobutirato (KMTB), aunque la AEE mostrada con éste es menor a la observada al utilizar piruvato.

Tabla 6. Actividad enzimática específica de transaminación de LiTAT y LiTAT_Tr con distintos sustratos oxoácidos y con tirosina. Las medidas finales son el resultado de la media de cuatro ensayos independientes.

Aminoácido	α -oxoácido	AEE de LiTAT (U·mg ⁻¹)	AEE de LiTAT_Tr (U·mg ⁻¹)
Tirosina	Piruvato	75 ± 6,9	82,3 ± 1,8
	α -cetoglutarato	0,3 ± 0,1	0,3 ± 0,2
	Oxalacetato	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0
	KMTB	30,9 ± 5,6	33,4 ± 3,4

4.4.2. Actividad enzimática específica de LiTAT en función del pH.

Para calcular el pH óptimo de transaminación de la tirosina se utilizó como co-sustrato el piruvato ya que con éste se obtenían los valores más altos de transaminación (Figura 29). En el rango de pH 6,5 – 10,5, la tasa de transaminación relativa es superior al 40%. Fuera de este rango los valores de transaminación relativa disminuyen considerablemente.

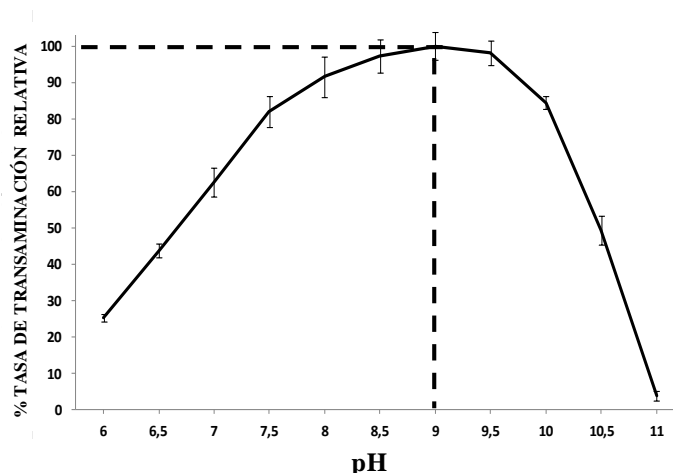


Figura 29. Estabilidad de LiTAT en disolución en función del pH. Tasa de transaminación relativa de LiTAT utilizando tirosina y piruvato como sustratos. La actividad de transaminación de LiTAT calculada con cada pH analizado, se dividió entre la actividad máxima de transaminación obtenida a pH 9,0, obteniéndose el valor de la tasa de transaminación relativa. La medida final en cada punto de la curva corresponde a la media de tres réplicas técnicas independientes.

4.5. Estudio de la ruta metabólica en la que participa LiTAT.

4.5.1. Actividad tirosina aminotransferasa en promastigotes de *L. infantum*.

Para el estudio de la capacidad de transaminación de la tirosina en las distintas fases de crecimiento de los promastigotes de *L. infantum*, se iniciaron cultivos a partir de un preinóculo en fase estacionaria y se recogieron muestras de proteína en fase logarítmica temprana (día 1), fase logarítmica media (día 3) y fase estacionaria (día 6).

La actividad enzimática específica de transaminación se analizó según el método descrito en el apartado 3.7.1. Como se observa en la Tabla 7, la tasa de transaminación entre el piruvato y la tirosina varía en las distintas fases de crecimiento de los promastigotes. La AEE de transaminación entre estos dos sustratos aumenta cinco veces aproximadamente al entrar en fase logarítmica media desde la fase logarítmica temprana y, una vez en fase estacionaria, dicha tasa de transaminación es diez veces superior a la inicial.

Como se ha explicado anteriormente, el producto resultante de la transaminación de la tirosina, el pHPP, es posteriormente reducido por una o varias deshidrogenasas no identificadas en una reacción dependiente de NAD(P)H. La actividad deshidrogenasa de pHPP en promastigotes de *L. infantum* se evaluó en las distintas fases de crecimiento en cultivo. En este caso no existen diferencias en la tasa de deshidrogenación del pHPP a pHPL entre las fases logarítmica temprana y logarítmica media. Sin embargo, dicha tasa de transaminación es dos veces mayor aproximadamente en un cultivo de promastigotes en fase estacionaria que en un cultivo en fase logarítmica (Tabla 7).

Tabla 7. Tasas de transaminación de tirosina y deshidrogenación de pHPP en distintas fases de crecimiento del cultivo de promastigotes de *L. infantum*. Las medidas finales son el resultado de la media aritmética de cuatro ensayos independientes utilizando 100 µg de extractos proteicos de promastigotes por ensayo.

Fase de crecimiento de los promastigotes	AEE de transaminación de tirosina a pHPP (U·mg ⁻¹)	AEE de deshidrogenación de pHPP a pHPL (U·mg ⁻¹)
Logarítmica temprana	3,6 x ± 0,9 (x 10 ⁻³)	8,2 x ± 1,2 (x 10 ⁻³)
Logarítmica media	17,9 x ± 3,4 (x 10 ⁻³)	8,5 x ± 1,4 (x 10 ⁻³)
Estacionaria	33,7 x ± 6,6 (x 10 ⁻³)	17,1 x ± 3,4 (x 10 ⁻³)

4.5.2. Detección del producto final del catabolismo de *L. infantum*.

Con el objetivo de identificar la localización del producto final del catabolismo de la tirosina en *L. infantum* (pHPL), se aisló la fase orgánica del sobrenadante de un cultivo axénico de promastigotes en fase estacionaria y se comparó su perfil cromatográfico (Figura 30) con el del pHPL estándar y el de la fase orgánica extraída del medio completo empleado en el cultivo de promastigotes (control negativo). Entre la mezcla de productos que aparecen en el perfil cromatográfico correspondiente al cultivo en fase estacionaria, destaca uno cuyo tiempo de elución (Te = 10,7 min) es similar al tiempo de elución del estándar de pHPL (Te = 11,14 min). Esta fracción se aisló, se derivatizó y se analizó mediante GC-MS. El espectro de masas del pico mayoritario obtenido tras la separación por GC (Te = 13,7 min), se comparó con el espectro de masas del estándar de pHPL resultando ambos idénticos.

De esta manera se confirmó la presencia de pHPL en el sobrenadante de un cultivo de promastigotes en fase estacionaria. La concentración final de pHPL en el medio de cultivo fue estimada por integración del área bajo la curva del pico en el perfil cromatográfico (utilizando el *software Agilent ChemStation*) y posterior extrapolación a la recta calculada con distintas concentraciones del estándar de pHPL (Anexo V) la cual resultó ser de 3,39 mM.

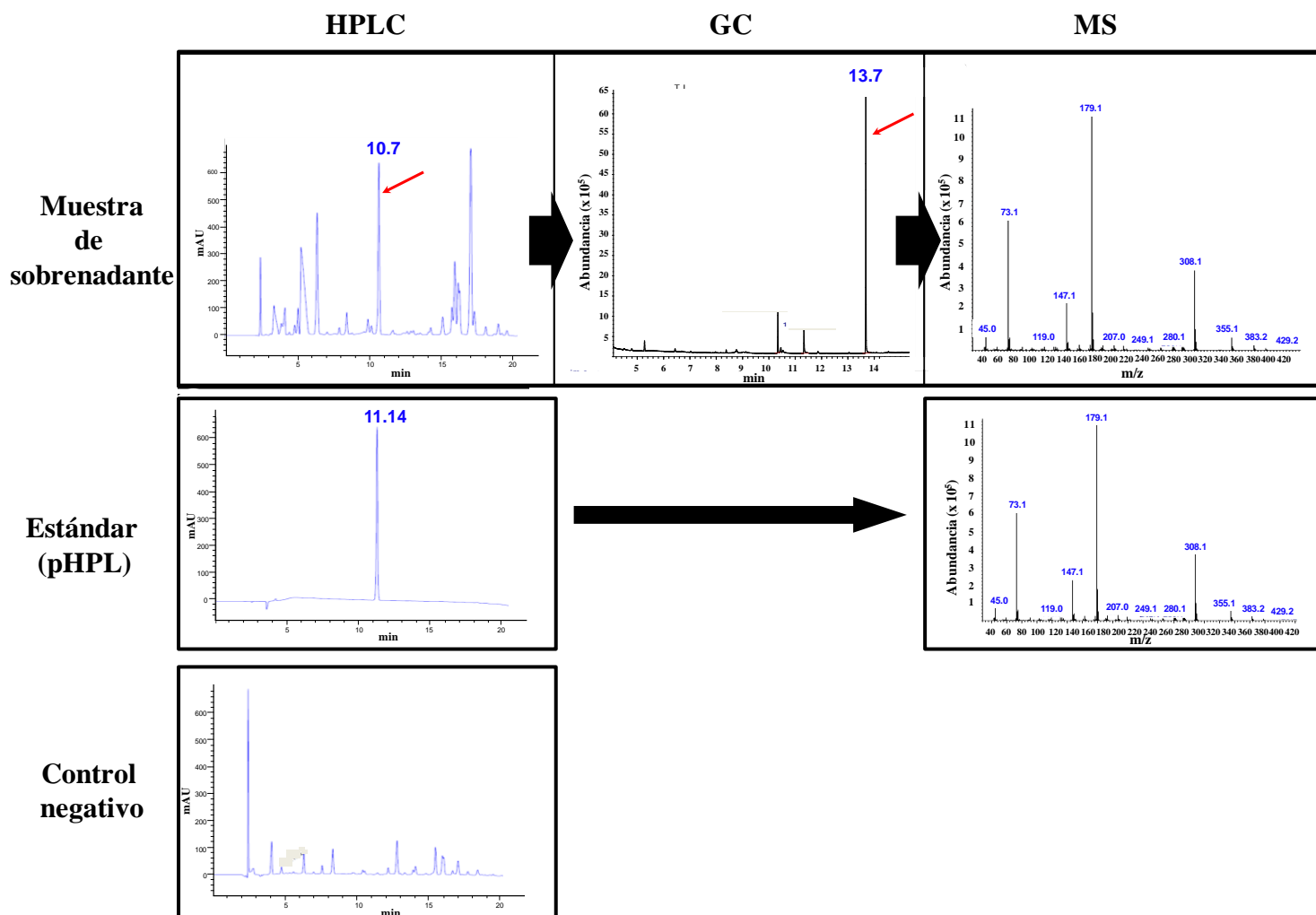


Figura 30. Detección del producto final del catabolismo de la tirosina en *L. infantum* (pHPL) en el sobrenadante de un cultivo en fase estacionaria de promastigotes. Los extractos obtenidos a partir de la fase orgánica del sobrenadante de un cultivo de promastigotes se analizaron por HPLC. El pico señalado con la flecha roja cuyo Te (10,7 min) era similar al del estándar (11,14 min) y no se observó en el control negativo se purificó por GC y la fracción observada en el cromatograma y señalada con una flecha roja cuyo Te era de 13,7 se analizó por MS. El espectro de masas de dicha fracción se comparó con el del estándar.

4.5.3. Identificación de proteínas que interaccionan con LiTAT mediante inmunoprecipitación.

Para identificar aquellas proteínas que podrían estar interaccionando con LiTAT y por tanto podrían ser susceptibles de estar involucradas en la ruta metabólica en la que participa esta enzima, se inmunoprecipitó dicha proteína en condiciones nativas. Para ello, se incubaron extractos proteicos de promastigotes de *L. infantum* en fase logarítmica temprana, ya que LiTAT se expresa principalmente en esta fase de crecimiento, con el anticuerpo policlonal anti-LiTAT purificado mediante cromatografía de afinidad (Anexo VI). Como control se utilizó el suero pre-inmune siguiendo el mismo procedimiento. Las proteínas inmovilizadas por el complejo anticuerpo-proteína A fueron eluidas en distintas fracciones. Aquellas fracciones en las que se identificó la presencia de LiTAT mediante *Western blot* fueron analizadas por 2DE (3.4.6.). Utilizando el *software PDQuest* se seleccionaron aquellos *spots* presentes en el gel con las proteínas reconocidas por el anticuerpo anti-LiTAT (Figura 31A), y ausentes en el gel con las proteínas reconocidas por el suero preinmune (Figura 31B). Estos *spots* fueron seleccionadas para la identificación de las proteínas por MALDI-TOF/TOF y, siguiendo simultáneamente el mismo procedimiento, se analizó, el área del gel control (suero policlonal) superpuesta a dichos puntos para asegurar que no había proteínas en ese área. El ensayo se repitió y se volvieron a identificar por MALDI-TOF/TOF aquellas proteínas reconocidas exclusivamente por el anticuerpo policlonal purificado. De las 18 proteínas identificadas por MALDI-TOF/TOF en

el primer ensayo, siete se volvieron a detectar en el segundo. Dos de estas siete correspondían a la proteína LiTAT con distinto pI aparente (5,6 y 5,8). El Mw (50 kDa) y el pI (5,6) de la forma mayoritaria de LiTAT calculados de forma empírica coinciden con los valores teóricos anotados en *TriTrypDB* (49,7 kDa y 5,61 respectivamente). Las otras cinco proteínas identificadas fueron la enzima málica (LinJ.24.0780), el factor de elongación 1-alfa (LinJ.17.0090), la arginil-tRNA sintetasa (LinJ.27.1230), una proteína-fosfatasa 2C (LinJ.25.0780) y una proteína hipotética (LinJ.14.0190) (Anexo VII).

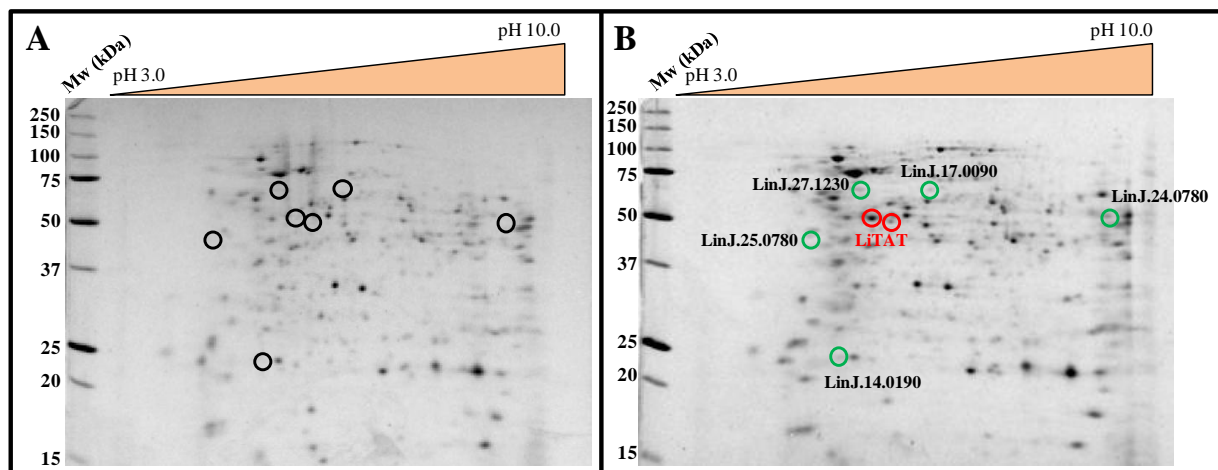


Figura 31. Identificación de proteínas que interactúan con LiTAT. (A) Electroforesis bidimensional de las proteínas inmunoprecipitadas con el suero pre-inmune y tinción con *Sypro Ruby*. (B) Electroforesis bidimensional con el anticuerpo policlonal anti-LiTAT purificado por afinidad y tinción con *Sypro Ruby*. Los puntos rodeados en rojo fueron identificados por MALDI TOF/TOF como LiTAT con distintos pI (~4.6 y ~4.8). Los puntos rodeados en verde corresponden a las proteínas inmunoprecipitadas con el anticuerpo anti-LiTAT en ambas réplicas del ensayo: enzima málica (LinJ.24.0780), factor de elongación 1-alfa (LinJ.17.0090), arginil-tRNA sintetasa (LinJ.27.1230), una proteína fosfatasa 2C (LinJ.25.0780) y una proteína hipotética (LinJ.14.0190).

En todas las proteínas identificadas por MALDI TOF/TOF, el Mw y el pI calculados de forma empírica coinciden con los valores teóricos anotados en la base de datos *TriTrypDB*. Una de las proteínas identificadas, la enzima málica, se encuentra anotada en la base de datos *TriTrypDB* como una oxidorreductasa, que pertenece a la superfamilia de las deshidrogenasas con un plegamiento de tipo *Rossmann* característico de unión a NAD(P)H y que permite la oxidorreducción de oxoácidos (*SCOP number* 51735). Existen dos genes parálogos de la enzima málica (LiMalDC) en el genoma de *L. infantum* (LinJ.24.0780 y LinJ.24.0790). Sin embargo, los péptidos identificados en el análisis por MALDI TOF/TOF correspondían exclusivamente a la proteína codificada por el gen LinJ.24.0780 (Anexo VII). Por ello esta proteína se caracterizó para evaluar su posible capacidad de reaccionar con oxoácidos aromáticos y su posible implicación en la ruta de degradación de la tirosina en *L. infantum*.

4.5.4. Purificación de enzimas con capacidad de reducir oxoácidos aromáticos en *L. infantum*.

La actividad de la proteína LiMalDC como deshidrogenasa de oxoácidos, se comparó en función del sustrato utilizado y del cofactor necesario con la de otras dos deshidrogenasas que habían sido propuestas previamente como candidatas para llevar a cabo la función de deshidrogenación de pHPP en pHPL, las proteínas Li-D2-HADH (Alcolea y col., 2009) y LicMDH (Leroux y col., 2006).

Para ello las secuencias nucleotídicas completas de los genes LinJ.24.0780 (gen que codifica para la proteína LiMalDC), LinJ28.3090 (gen de la proteína LicMDH) y LinJ.34.4360 (codificante para la proteína LiD2-HADH)

se clonaron en el vector plasmídico pAVA0421 en células *E. coli* cepa DH5 α . Las construcciones resultantes se transformaron en la cepa de expresión BL21(DE3)pLysS y se expresaron tal y como se ha descrito previamente (apartado 3.5.3.1.). En el caso de las proteínas LiMalDC (Figura 32) y LiD2-HADH (Figura 33A), al inducir su expresión se observó la aparición de una nueva banda coincidente con la suma del Mw teórico de cada proteína más la cola de histidinas en posición N-terminal (65 y 39 kDa respectivamente). Sin embargo, al inducir la expresión de LicMDH no se pudo identificar la aparición de ninguna banda a la altura esperada pero sí que existía una nueva banda de ~13 kDa (Figura 33B) que fue confirmada posteriormente mediante *Western blot* con un anticuerpo anti-6XHis que se trataba de una forma incompleta de la proteína recombinante (Anexo VIII). Por tanto para poder expresar LicMDH, se utilizaron células BL21(DE3)pLysS *Rosetta*TM 2. En este caso la inducción de la expresión de la proteína en esta cepa, permitió expresar la proteína recombinante con el Mw esperado (36 kDa).

Al expresar LiMalDC y LicMDH, se consiguieron purificar las proteínas recombinantes correspondientes en condiciones nativas dado que existía una proporción de la proteína expresada en forma soluble en el sobrenadante de la lisis celular. Con las condiciones de expresión utilizadas, en el caso de LiD2-HADH no se obtuvo suficiente cantidad suficiente de proteína soluble como para desarrollar los ensayos de actividad de la proteína. La adición del coenzima NADH en el medio de cultivo y en los tampones de lisis y de purificación permitió obtener suficiente cantidad de proteína soluble (Figura 33A). En la purificación de LiMalDC, el rendimiento obtenido de la proteína soluble nativa fue aproximadamente de 0,15 mg de proteína purificada/L de cultivo. En el caso de LicMDH el rendimiento final de purificación se estimó en torno a 6,4 mg de proteína purificada/L de cultivo y en LiD2-HADH fue de 2,5 mg de proteína purificada/L de cultivo. Las eluciones obtenidas de la cromatografía por afinidad permitieron obtener fracciones homogéneas de cada una de las proteínas con una pureza superior al 90% (cuantificada por densitometría en gel).

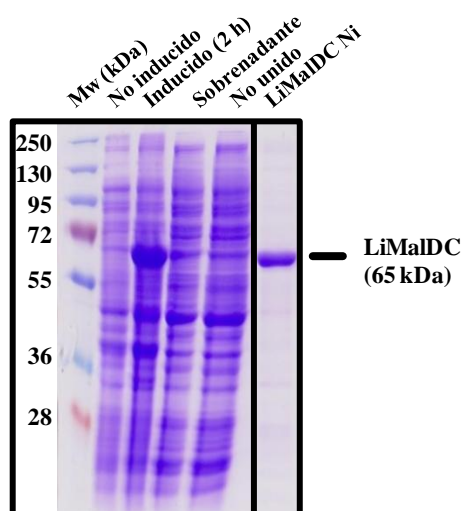


Figura 32. Expresión y purificación de LiMalDC analizadas por SDS-PAGE y tinción con Coomassie. Mw: Marcador de pesos moleculares; No Inducido: extractos de proteína de *E. coli* cepa BL21(DE3)pLysS; Inducido (2h): extractos de proteína de *E. coli* cepa BL21(DE3)pLysS inducidos con IPTG durante 2 h para expresar la proteína LiMalDC; Sobrenadante: fracción de proteínas solubles resultantes de la lisis de las células inducidas con IPTG; No unido: proteínas solubles no unidas por afinidad a la columna con níquel; LiMalDC Ni: proteína soluble purificada por afinidad con níquel.

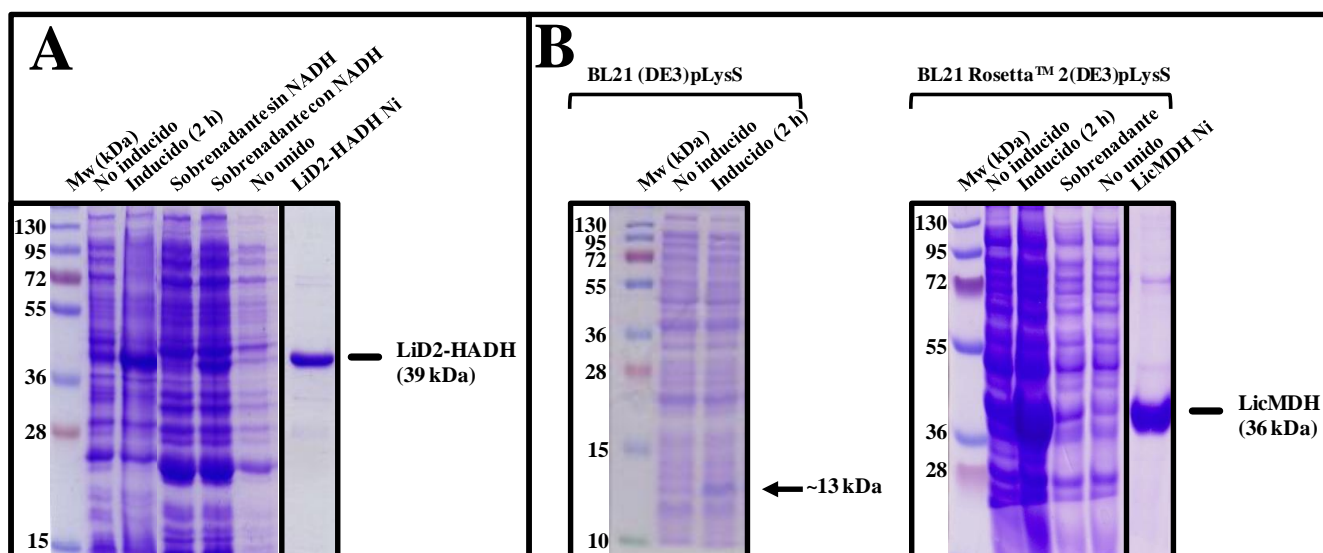


Figura 33. (A) Expresión y purificación de LiD2-HADH analizadas por SDS-PAGE y tinción con Coomassie. Mw: marcador de pesos moleculares; No Inducido: extractos de proteína de *E. coli* cepa BL21(DE3)pLysS; Inducido (2h): extractos de proteína de *E. coli* cepa BL21(DE3)pLysS inducidos con IPTG durante 2 h para expresar la proteína LiD2-HADH; Sobrenadante sin NADH: fracción de proteínas solubles resultante de la lisis de las células inducidas con IPTG; Sobrenadante con NADH: fracción de proteínas solubles resultante de la lisis de las células inducidas con IPTG a las que se había añadido NADH 0,2 mM; No unido: proteínas solubles no unidas por afinidad a la columna con níquel; LiD2-HADH Ni: proteína soluble purificada por afinidad con níquel. **(B) Expresión y purificación de LicMDH analizadas por SDS-PAGE y tinción con Coomassie.** expresión de LicMDH en células *E. coli* cepa BL21 (DE3)pLysS a la izquierda (la forma incompleta mayoritaria de LicMDH se señala con una flecha) y BL21 (DE3)pLysS RosettaTM 2 (a la derecha) y purificación de la proteína por cromatografía de afinidad con níquel (LicMDH Ni) obtenida a partir de los extractos proteicos solubles de esta última (sobrenadante). Mw: marcador de pesos moleculares; No Inducido: extractos de proteína de *E. coli* cepa BL21(DE3)pLysS; Inducido (2h): extractos de proteína de *E. coli* inducidos con IPTG durante 2 h para expresar la proteína LicMDH; Sobrenadante: fracción de proteínas solubles resultantes de la lisis de las células inducidas con IPTG; No unido: proteínas solubles no unidas por afinidad a la columna con níquel; LicMDH Ni: proteína soluble purificada por afinidad con níquel.

A continuación se desarrollaron los ensayos de actividad, según el procedimiento indicado previamente (apartado 3.7.4.). La capacidad de deshidrogenación de cuatro oxoácidos (piruvato, oxalacetato, fenilpiruvato y pHPP) se ensayó con cada una de las tres proteínas purificadas utilizando como cofactores tanto NADH como NADPH.

La enzima LiMalDC es capaz de reducir oxoácidos utilizando como coenzima NADPH con mayor AEE (Tabla 8). Los sustratos que esta enzima deshidrogena preferentemente son el piruvato y el oxalacetato. Además es capaz de deshidrogenar pHPP y fenilpiruvato. La enzima LicMDH también presenta actividad deshidrogenasa con los derivados aromáticos citados. No obstante, esta enzima sólo es capaz de reducir sustratos utilizando NADH como cofactor y la mayor actividad enzimática tiene lugar con el piruvato seguida del oxalacetato. Por otra parte, la proteína LiD2-HADH no mostró actividad específica de deshidrogenación en las condiciones del ensayo y con ninguno de los reactivos utilizados.

Tabla 8. Actividad enzimática específica de deshidrogenación de las enzimas LiMalDC, LicMDH y LiD2-HADH. En todos los casos, se indica la actividad enzimática en el sentido de reducción de los sustratos utilizados. Se proporcionan la media y la desviación estándar de 4 réplicas técnicas.

Sustratos	Cofactor (0.5 mM)	AEE de LiMalDC (U·mg ⁻¹)	AEE de LicMDH (U·mg ⁻¹)	AEE de LiD2-HADH (U·mg ⁻¹)
Piruvato	NADPH	415,3 ± 19,7	1,9 ± 0,1	0,0
	NADH	8,4 ± 1,5	516,7 ± 21,5	0,0
Oxalacetato	NADPH	267,4 ± 20,1	3,1 ± 0,2	0,0
	NADH	10,5 ± 2,9	437,6 ± 61,0	0,0
pHPP	NADPH	65,2 ± 1,8	0,0	0,0
	NADH	0,9 ± 0,3	73,4 ± 8,9	0,0
Fenilpiruvato	NADPH	74,5 ± 3,6	0,0	0,0
	NADH	0,9 ± 0,4	121,0 ± 4,2	0,0

4.5.5. Perfil de expresión de LiMalDC en el ciclo biológico de *L. infantum*.

Se analizó la expresión de la proteína LiMalDC, con capacidad reductora de los oxoácidos aromáticos, en los distintos estadios del ciclo de *L. infantum* mediante *Western blot* y utilizando un anticuerpo policlonal generado según se especifica en el apartado 3.6.1.

La proteína LiMalDC se detecta en todas las fases de crecimiento del cultivo de promastigotes. Sin embargo, la expresión relativa de LiMalDC disminuye diariamente un 30% aproximadamente (Figura 34B). Por otro lado, la expresión relativa de LiMalDC en los promastigotes metacíclicos aislados por los dos métodos descritos en el apartado 3.2.3.3., es menor al compararla con la de los promastigotes procíclicos, aunque se detecta en ambas subpoblaciones. Sin embargo, esta diferencia es mayor en los promastigotes metacíclicos aislados por PNA (Figura 34B).

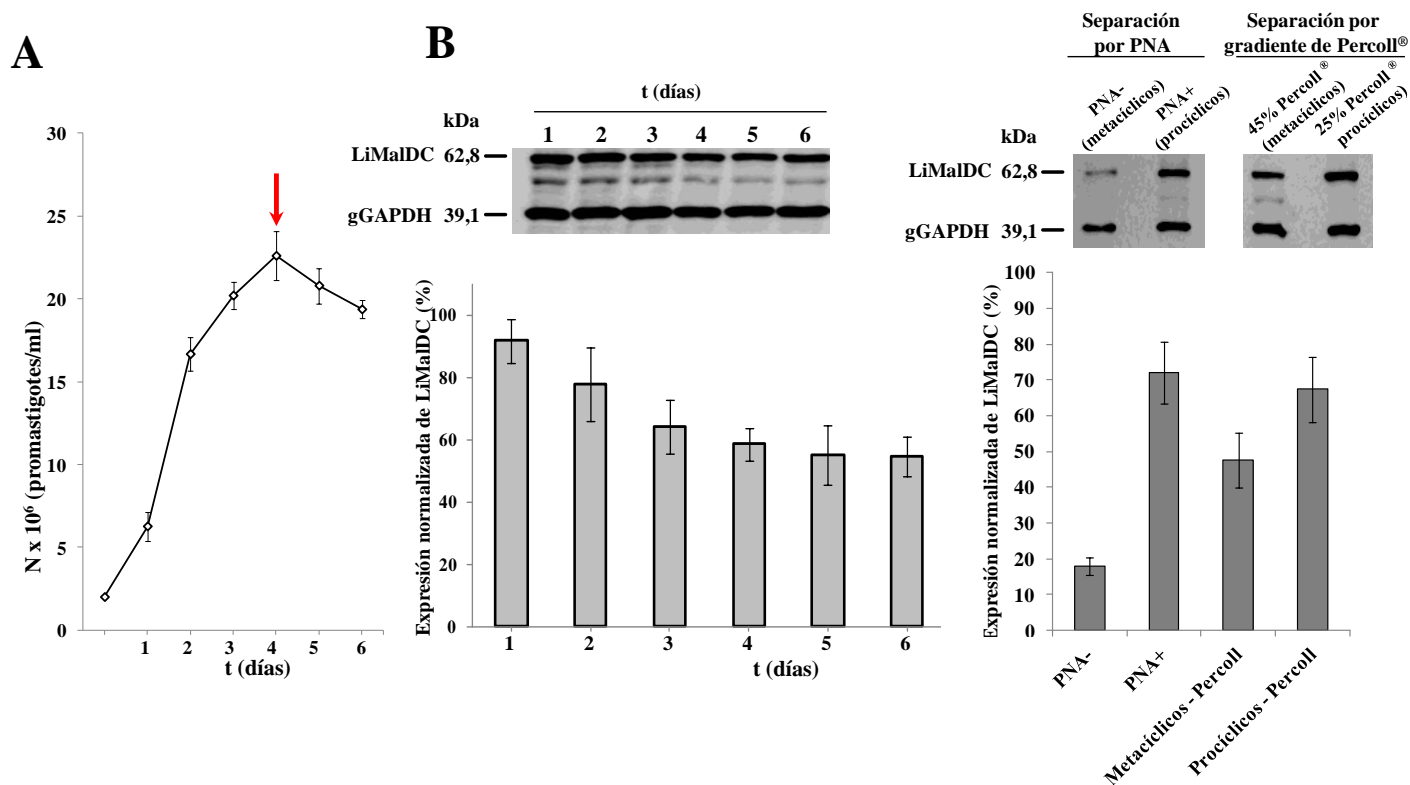


Figura 34. Perfil de expresión de LiMalDC en promastigotes de *L. infantum*. (A) Curva de crecimiento medio de promastigotes en cultivo de *L. infantum*. (B) Análisis por Western blot de la expresión relativa de LiMalDC en las distintas fases de la curva crecimiento de promastigote y en extractos totales de promastigotes procíclicos y metacíclicos aislados por selección negativa con PNA y por gradiente con Percoll® obtenidos a partir del cultivo en fase estacionaria (flecha roja en A). Los niveles de expresión de LiMalDC fueron normalizados frente a la expresión constitutiva del control de carga gGAPDH. En los histogramas se representan la media \pm SD de la expresión normalizada de LiMalDC.

En el estadio amastigote, el nivel de expresión relativo de LiMalDC es similar al observado en el estadio promastigote en fase estacionaria. Sin embargo, al comparar los amastigotes intracelulares con los axénicos (Figura 35), se aprecia mayor expresión de LiMalDC (25% aproximadamente) en estos últimos.

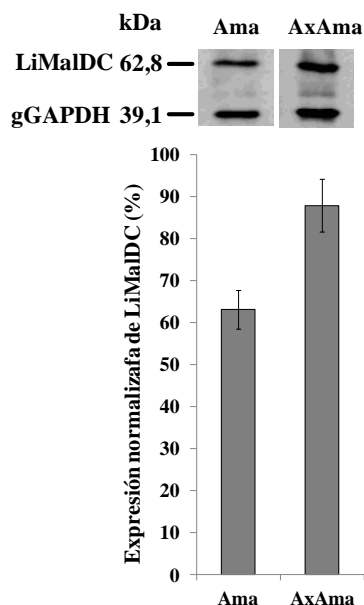


Figura 35. Expresión de LiMalDC en amastigotes intracelulares (Ama) y amastigotes axénicos (AxAma) de *L. infantum*. Análisis por Western blot de la expresión de LiMalDC en extractos proteicos. Los niveles de expresión de LiMalDC fueron normalizados frente a la expresión constitutiva del control de carga gGAPDH. En el histograma se representan la media \pm SD de la expresión normalizada de LiMalDC.

Por otra parte, la expresión de LiMalDC en promastigotes en fase logarítmica temprana de *L. infantum* (*chagasi*) es ligeramente superior en la cepa resistente a altas concentraciones de NO que en la cepa sensible (Figura 36B).

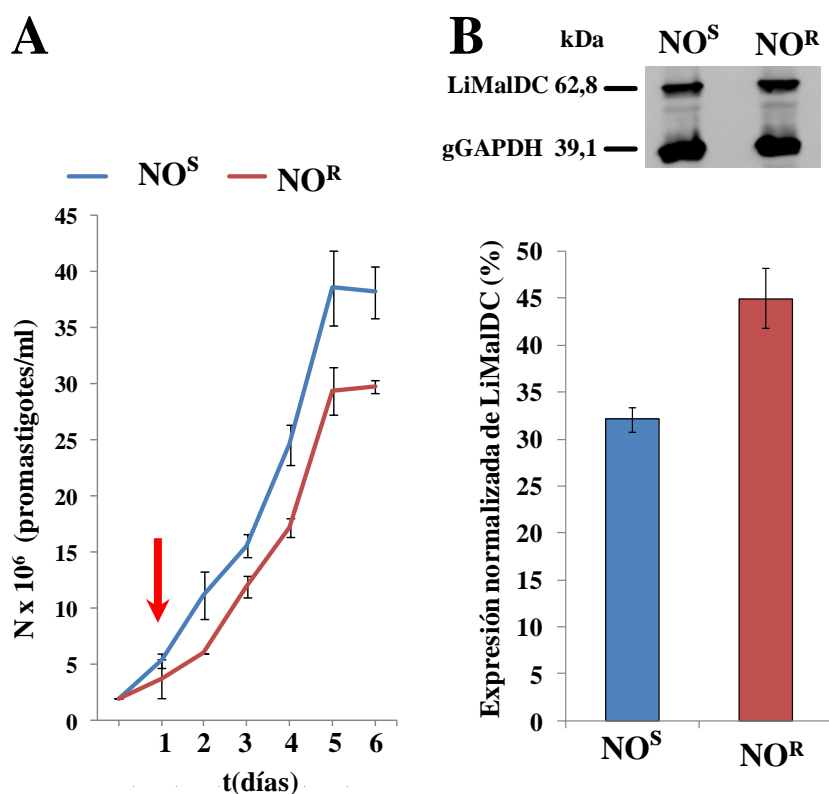


Figura 36. Análisis de la expresión de LiTAT en promastigotes de *L. infantum* (*chagasi*) resistentes a óxido nítrico (NO). (A) Curva de crecimiento medio de los promastigotes de *L. chagasi*. (B) Se analizó la expresión de LiMalDC por Western blot en la fase logarítmica temprana a día 1 (flecha roja en A). NO^S: Cepa sensible a NO; NO^R: Cepa resistente a NO. Los niveles de expresión de LiTAT fueron normalizados frente a la expresión constitutiva del control de carga gGAPDH. En los diagramas de barras se representan la media \pm SD de la expresión normalizada de LiMalDC de tres réplicas biológicas independientes.

4.5.6. Localización subcelular de LiMalDC.

La localización subcelular de LiMalDC es citoplasmática, según lo observado mediante un ensayo por gradiente con digitonina utilizando como control la proteína gGAPDH (Figura 37).

La concentración de digitonina necesaria para la solubilización del 75% de LiMalDC en el sobrenadante (SN) es de 0,1 mg de digitonina/mg de proteína total, mientras que para la extracción del mismo porcentaje de la proteína gGAPDH se necesitaron 10 veces más de concentración de detergente. A una concentración de digitonina de 0,1 mg/mg de proteína total se extrajo más del 60% de la proteína. Sin embargo, para solubilizar el 100% de la proteína LiMalDC se requiere una concentración de detergente de 5 mg/mg de proteína total, (la misma concentración necesaria para solubilizar la proteína gGAPDH).

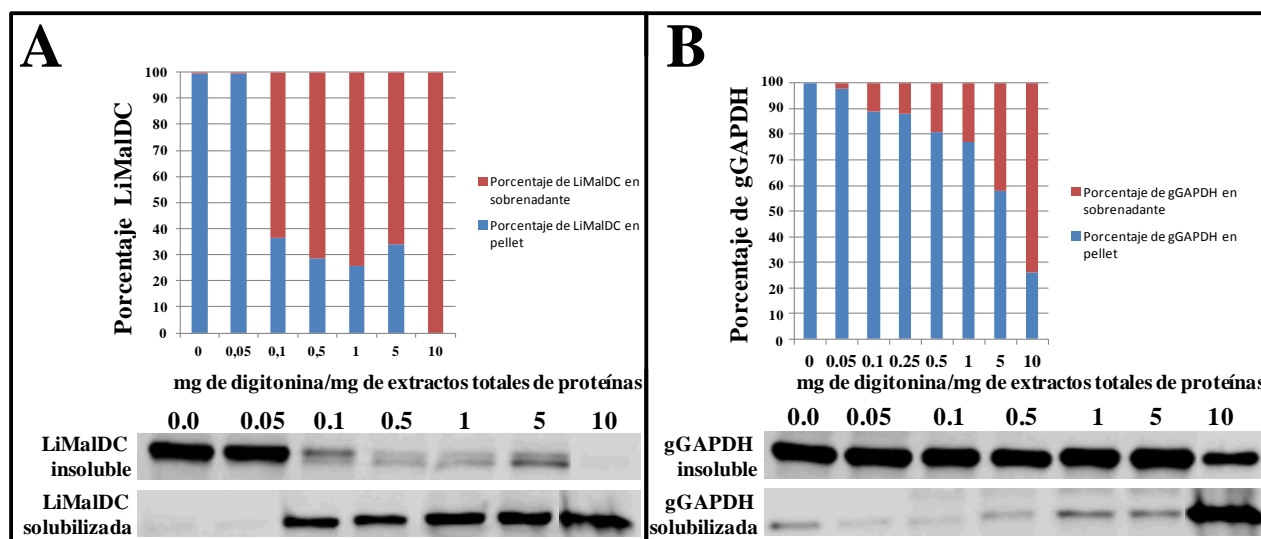


Figura 37. Análisis de la localización subcelular de LiMalDC a partir de las fracciones obtenidas de un gradiente de digitonina. Las fracciones correspondientes al gradiente con digitonina se analizaron por *Western blot* con los anticuerpos específicos anti-LiMalDC y anti-gGAPDH.

4.5.7. Modelado de la proteína LiMalDC y predicción del acoplamiento molecular de pHPP en el centro activo.

La estructura de LiMALDC fue predicha utilizando como modelo la secuencia de la proteína MalDC humana (código PDB: 2AW5), puesto que fue seleccionada como la proteína con mayor identidad de secuencia (40%) cuya estructura ha sido resuelta y está registrada en la base de datos PDB. La calidad del modelo obtenido, se evaluó mediante los diagramas de *Ramachandran* (Lovell y col., 2003) y de *Errat* (Colovos y Yeates, 1993). En ambos casos, los valores obtenidos permitieron validar el modelado por homología obtenido (Anexos IX y X).

Mediante simulación del acoplamiento molecular entre el modelo obtenido y la coenzima NADPH, se predijeron los residuos responsables de la interacción con NADPH incluyendo la lisina responsable de que la enzima reaccione mejor con NADPH que con NADH. En este caso se utilizó la estructura completa del modelo de LiMalDC para desarrollar los estudios de acoplamiento molecular. En el modelo obtenido, los residuos Thr340 y Lys356 (Figura 38A) se dirigen hacia el 2'-fosfato del NADPH. La cadena lateral de Lys363 (que se corresponde, según el alineamiento mostrado en la parte de arriba de la figura 38A, con la lisina encargada de la selectividad entre NADH y NADPH en *H. sapiens*) está muy alejada y orientada en sentido opuesto al grupo 2'-fosfato del NADPH. Sin embargo, en este caso la cadena lateral del residuo Lys356, que forma parte de una región de la proteína no conservada en la LiMalDC de *H. sapiens* (tal y como se indica en el alineamiento de secuencia en la parte superior de la figura 38A), sí se dispone orientada hacia el grupo 2'-fosfato del NADPH.

Dada la capacidad de la enzima de reaccionar con oxoácidos derivados de aminoácidos aromáticos (apartado 4.4.1., Tabla 8), se evaluó por acoplamiento molecular la disposición que adoptan tanto el 2-oxoácido pHPP (Figura 38B) como el manganeso (Mn^{2+}) en presencia de la coenzima NADPH. El grupo C2 del oxoácido pHPP está orientado hacia el átomo C4 a 4,5 Å del anillo nicotinamida del NADPH. El residuo Lys177, que ha sido descrito como clave en el proceso de oxidación/reducción de los oxoácidos (Tao y col., 2003), se encuentra a 5,1 Å del carbonilo C2 del pHPP. Por otro lado la Tyr107, que actúa como ácido con respecto a la Lys177, se sitúa a 2,2 Å de ésta última.

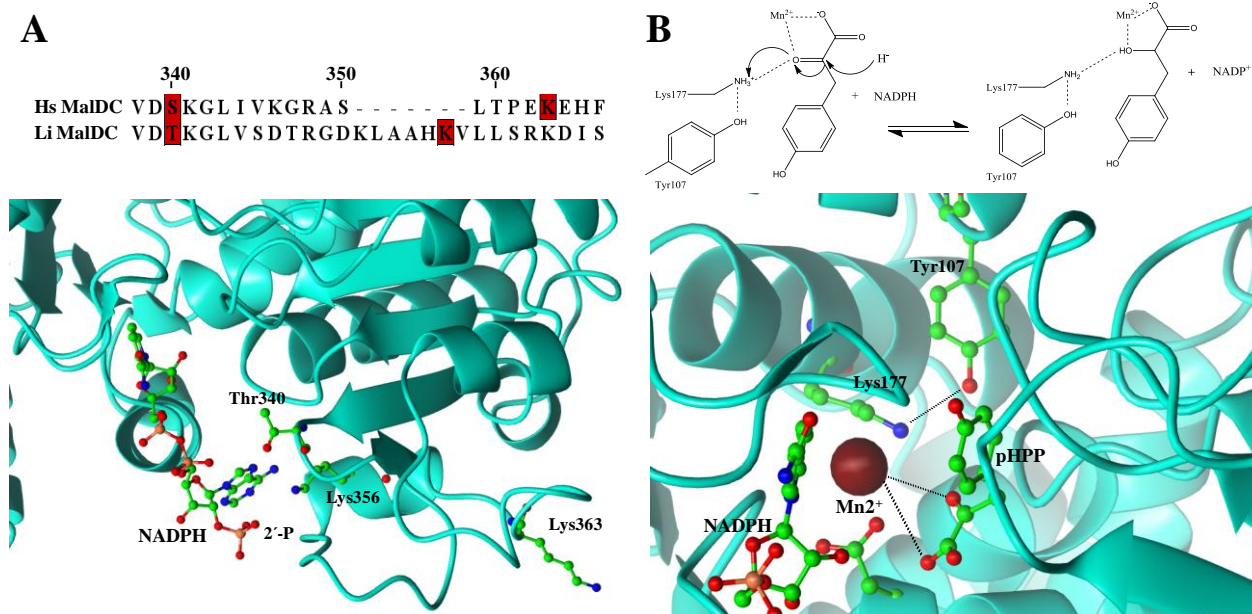


Figura 38. Modelado por homología de la proteína LiMalDC y acoplamiento molecular *in silico* de NADPH y pHPP. (A) Representación de la estructura secundaria de la proteína LiMalDC modelada por homología con el coenzima NADPH unido al centro activo del enzima. En la parte superior de la figura se muestra un alineamiento múltiple de la secuencia de aminoácidos de LiMalDC con su ortólogo en *H. sapiens* (HsMalDC; PDB: 2AW5) y con los residuos descritos que posibilitan la preferencia de la enzima por el NADP(H) frente al NAD(H) resaltados en rojo. (B). Disposición espacial adoptada por el oxoácido pHPP para ser reducido a pHPL en presencia del coenzima NADPH. Centro activo de deshidrogenación de LiMalDC con el pHPP orientado hacia el Mn^{2+} . En la parte superior se muestra el mecanismo catalítico para la reacción de deshidrogenación del pHPP por LiMalDC propuesto en base al mecanismo catalítico general de las enzimas málicas. La estructura secundaria que forma el centro activo de LiMalDC en el modelo, se indica en cian en un modelo de α -hélices y láminas β . Los átomos de carbono, oxígeno, nitrógeno, fósforo y manganeso se muestran en un modelo de barras y esferas en verde, rojo, azul oscuro, naranja y marrón respectivamente.

4.6. Ensayo de protección de ratones de la cepa BALB/c con LiTAT frente a la infección experimental con *L. infantum*.

En el experimento de inmunización, se consideraron dos grupos control y un grupo experimental con cuatro ratones en cada grupo, los cuales se sacrificaron a los dos meses tras la infección con *L. infantum*. En el grupo control negativo, los ratones no se infectaron y no se inmunizaron. En el grupo control positivo los ratones se infectaron sin haber sido previamente inmunizados y en el grupo experimental los ratones se había inmunizado previamente tal y como se describe en el apartado 3.11.

Al sacrificar los ratones y realizar las necropsias, no se observó esplenomegalia ni hepatomegalia en los animales infectados. El análisis de la carga parasitaria en el bazo se realizó mediante qPCR utilizando el método de las sondas *TaqMan*[®] para la cuantificación del ADN del parásito (apartado 3.3.5.). La cuantificación de la carga parasitaria normalizada (Qn) se realizó mediante el método ΔC_t corregido con la eficiencia y normalizando los resultados obtenidos frente al GOR (18S rRNA) (apartado 3.3.5.). Al representar los datos de Qn normalizada (Figura 39), el grupo control positivo (sin inmunizar) presenta valores de carga parasitaria mayores a los del grupo experimental (inmunizado). Por otro lado, en el grupo control negativo no se detectó ADN del parásito. Tras aplicar el test estadístico no paramétrico para muestras independientes de *Mann-Whitney* se encontró que las diferencias halladas en la carga parasitaria de los grupos inmunizado y no inmunizado no son estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

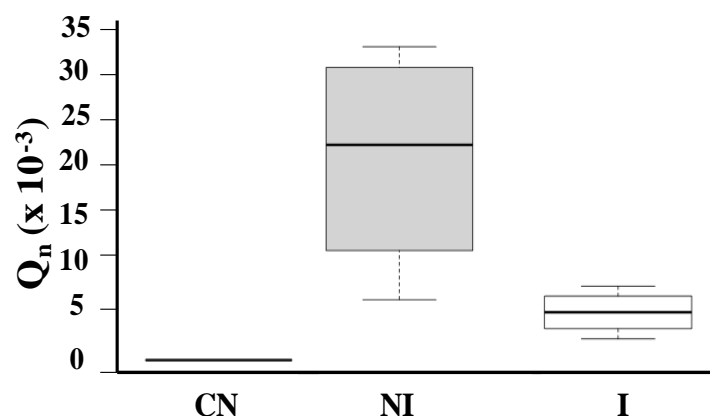


Figura 39. Estudio de la carga parasitaria en ratones infectados inmunizados con LiTAT. Diagrama de cajas basado en cuartiles. Se representan el primer (25%) y el tercer cuartil (75%) con las medianas de cada grupo y los valores máximos y mínimos. CN: Grupo control negativo (ratones sin infectar ni inmunizar); NI grupo control positivo (ratones infectados sin inmunizar con LiTAT); I: grupo experimental (ratones infectados e inmunizados con LiTAT). Se representa la cantidad relativa de ADN de *L. infantum* normalizada respecto a ADN del 18S RNA (Q_n) obtenida mediante *qPCR* en tiempo real.

4.7. Análisis estructural y funcional de la proteína LiTAT.

4.7.1. Resolución de la estructura de LiTAT mediante cristalografía de rayos X.

Las condiciones de cristalización ensayadas con las proteínas recombinantes purificadas LiTAT y LiTAT_Tr se llevaron a cabo en el laboratorio *Emerald Biostructures* (Bainbridge Island, WA, Estados Unidos) bajo la dirección del Dr. Peter Myler, mediante la técnica de difusión de vapor en gota sentada, que permitió el crecimiento de cristales hexagonales amarillos, debido al cofactor PLP unido a la apoenzima (Figura 40). Se ensayaron distintas condiciones para obtener cristales que proporcionaran la mejor resolución posible. Finalmente, se utilizó la condición B11 del sistema de cribado Morpheus para el crecimiento de cristales de ambas proteínas. La resolución obtenida con los cristales de la proteína LiTAT era mayor (3,0 Å) que la obtenida con los cristales de LiTAT_Tr (2,35 Å) y además no se observaba una estructura secundaria definida del extremo N-terminal de 38 aminoácidos de LiTAT. Por ello se obtuvo el mapa de densidad electrónica de la estructura de LiTAT_Tr con una resolución final de 2,35 Å considerándose a partir de ahora como LiTAT. Los factores estructurales y las coordenadas de la proteína se depositaron en la base de datos *Protein Data Bank* con el código PDB-4IX8.

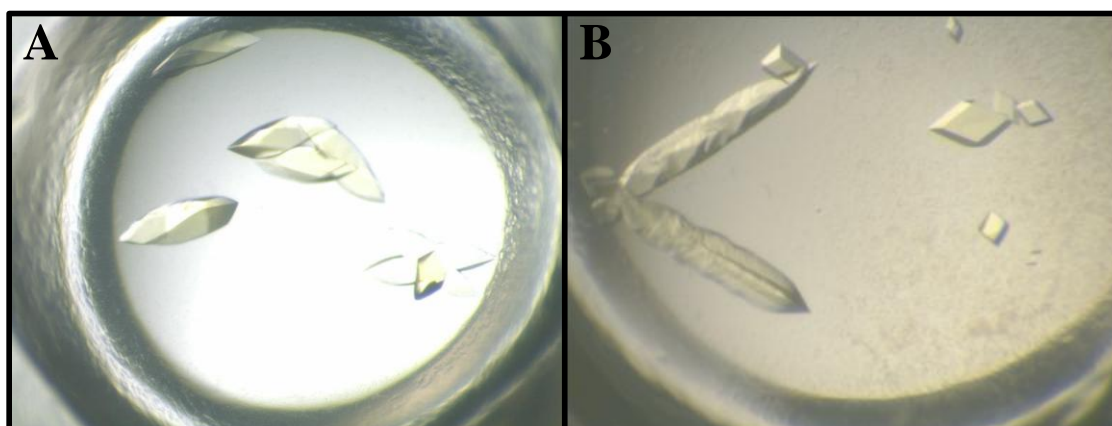


Figura 40. (A) Cristales hexagonales de LiTAT. (B) Cristales hexagonales de LiTAT_Tr.

Los datos de difracción y refinamiento correspondientes a la proteína LiTAT se encuentran reflejados en la Tabla 9. El modelo cristalográfico final de LiTAT_Tr unida a PLP tiene un factor R_{work} de 17.3% (factor de desacuerdo entre el 80% de las observaciones experimentales) y un valor R_{free} de 20.3% (factor de desacuerdo entre el 100% de las observaciones experimentales). El factor de acuerdo entre las múltiples medidas obtenidas durante la difracción (R_{merge}) se encuentra en el intervalo considerado como aceptable para un modelo de calidad (Wlodawer y col., 2015). Las desviaciones estándar de la medias cuadráticas mínimas (RMSD) de las coordenadas de los enlaces y los ángulos también se encuentran dentro de los rangos óptimos (Wlodawer y col., 2008). La relación señal/ruido (I/σ) según lo esperado es mayor a dos. La unidad asimétrica del cristal tiene un grupo espacial de $P3_221$ y está formada por dos cadenas polipeptídicas idénticas (A y B), formando un homodímero. En el caso de la cadena A de LiTAT_Tr, la disposición desordenada de los residuos Asp62-Asn63 impidió su resolución. En la subunidad B no pudieron ser resueltos los residuos Asp62-Ser72, Glu363-Gly367, Lys382-Ser39, Glu404-Glu405 y Ile439-Lys448.

Tabla 9. Parámetros de difracción y refinamiento de la proteína LiTAT_Tr. Los valores entre paréntesis en los datos de difracción están referidos al modelo de mínima resolución de los 20 obtenidos.

Datos de difracción		Refinamiento	
Grupo espacial	$P3_221$	R_{work}	0.173
Parámetros de unidad de celda	$a=b=98.96 \text{ \AA}$	R_{free}	0.206
	$c=199.26 \text{ \AA}$	RMSD enlaces (Å)	0.012
Resolución [Å]	50-2.35 (2.41-2.35)	RMSD ángulos (°)	1.35
Media I/σ ($I > 2$)	13.8 (2.6)	Ramachandran, favorecido	745 (97.9%)
R_{merge}	0.069 (0.563)	Ramchandran, valores atípicos	No
Integridad de la estructura	99.8% (99.9%)	Molprobitity clashscore ^(Chen et al., 2010)	1.31 (100 th percentile)
Multiplicidad (Nº de nodos/celda)	4.6 (4.7)	Molprobitity score ^(Chen et al., 2010)	0.88 (100 th percentile)
Número de reflexiones únicas	47,821 (3,479)	Código PDB	4IX8

4.7.2. Estructura de LiTAT.

La unidad asimétrica del cristal con el grupo espacial $P3_221$ está formada por dos cadenas polipeptídicas idénticas formando un homodímero. En la Figura 41 se muestra la representación tridimensional del homodímero de LiTAT en un modelo de α -hélices y láminas β . La estructura de cada una de las subunidades del homodímero de LiTAT presenta un plegamiento con dos dominios principales. El dominio de mayor extensión se encuentra entre los residuos Asp91-Arg339 y forma el núcleo interno, que tiene una estructura tipo $\alpha/\beta/\alpha$. Este dominio presenta siete láminas β que rodean al cofactor y ayudan a estabilizarlo, siendo la lámina β_2 antiparalela al resto. El núcleo de láminas β está rodeado por siete α -hélices.

El dominio más pequeño es discontinuo y está formado por los extremos N (Lys65-Pro90) y C-terminal (Thr340-Lys448) y constituye el dominio de unión a sustratos. Parte del extremo N-terminal (desde la Ser40 hasta la Ser47 ambos incluidos) está involucrado en la interacción entre ambas subunidades del homodímero y presenta una α -hélice adicional. LiTAT posee 13 residuos de cisteína por subunidad. Sin embargo, en las condiciones utilizadas para la cristalización, no se identificaron puentes disulfuro. Además, existen dos iones Cl^- en la interfaz de las dos subunidades sin una función descrita.

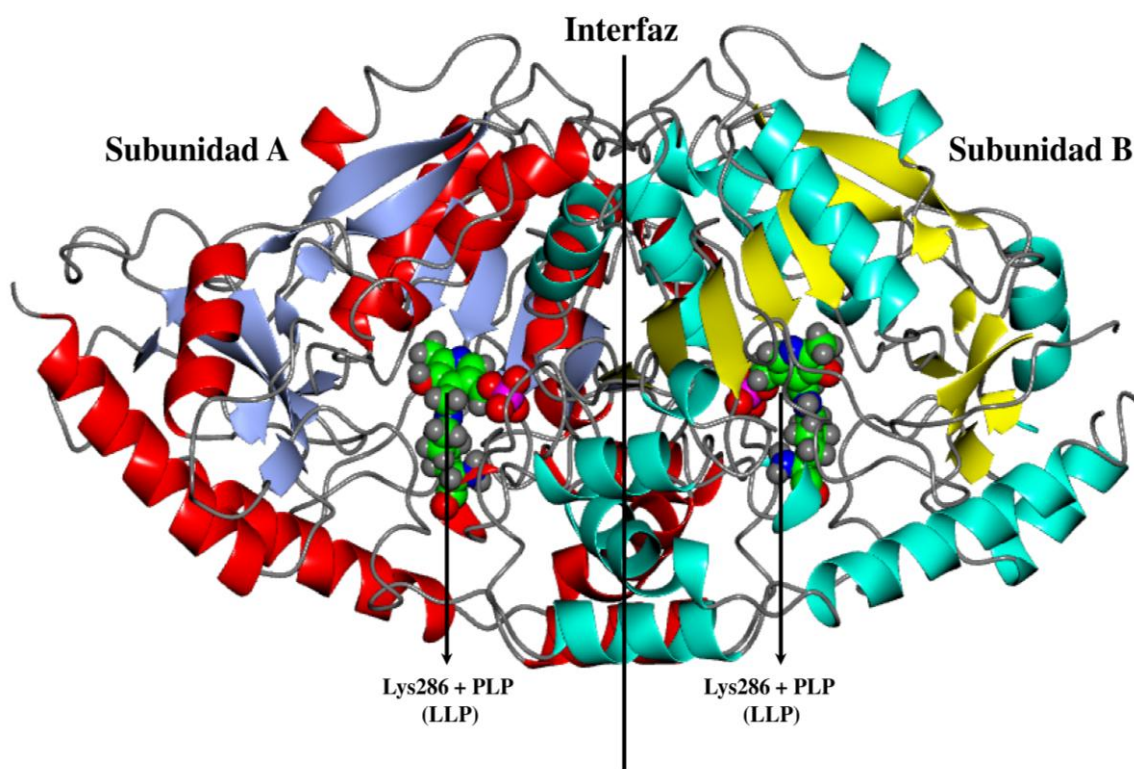


Figura 41. Estructura dimérica de LiTAT_Tr resuelta a 2.35 Å. En la subunidad A, las láminas β se muestran en rojo y las α -hélices en azul, mientras que en la subunidad B se muestran en amarillo y en cian, respectivamente. La molécula de PLP unida al residuo Lys286 se destaca en cada subunidad con un modelo de esferas con el siguiente código de colores: C (verde), O (rojo), N (azul), P (magenta) y H (gris).

4.7.3. Configuración del centro activo de LiTAT con piridoxal fosfato.

La resolución de la estructura de LiTAT unida a PLP permitió identificar los residuos que participan en la estabilización del mismo y que facilitan la reacción de transaminación.

El centro activo de cada subunidad es adyacente a la interfaz dimérica y en el mismo participan residuos de ambas subunidades (Figura 42A). La coenzima PLP se une covalentemente a la Lys286 formando una base de *Schiff* cuyo doble enlace forma un ángulo de 109° con el anillo piridínico del PLP. Esto indica que el doble enlace no está protonado en el tampón de cristalización a pH 8,5, por lo que su valor de pK_a es inferior a 8,5. Por otro lado, el ángulo de torsión (χ_4) de la cadena lateral de Lys253 es de 4° .

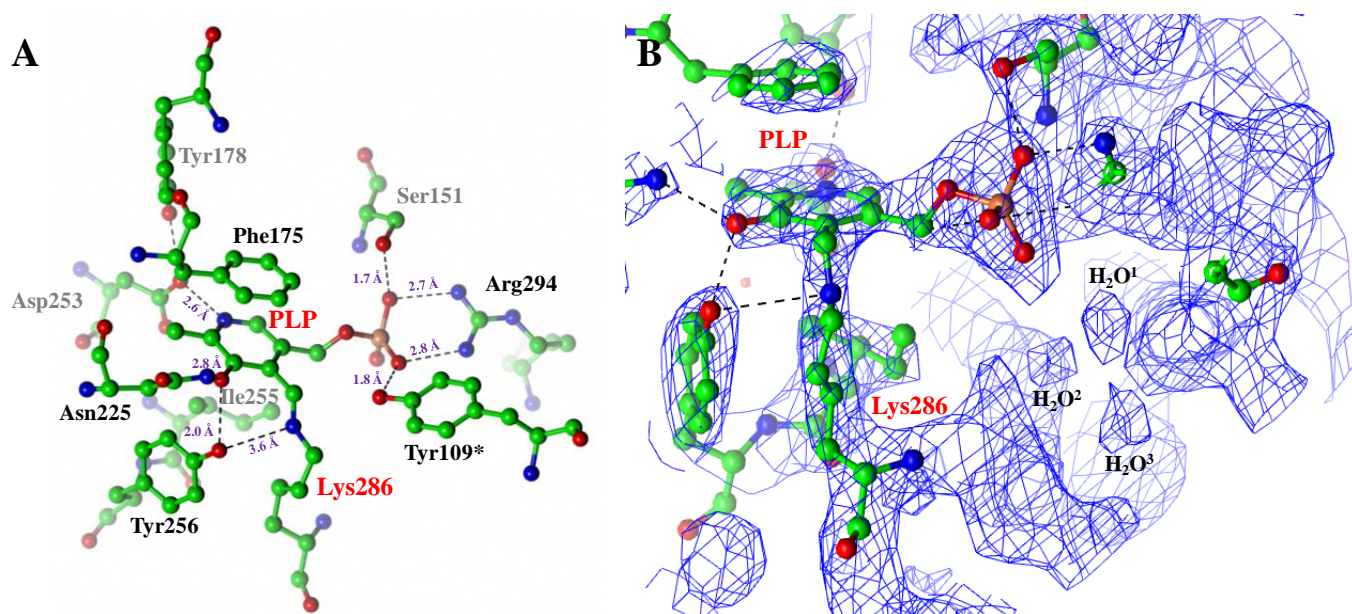


Figura 42. Centro activo de la subunidad A de la proteína. (A) El cofactor piridoxal fosfato (PLP), representado con el modelo de barras y esferas, está unido covalentemente al residuo de Lys286 y rodeado de aquellos que participan en la estabilización del cofactor. Los átomos de C, O, N y P se muestran en verde, rojo, azul y naranja respectivamente. Los enlaces intermoleculares que participan en la estabilización del cofactor se indican con líneas discontinuas negras. El residuo marcado con un asterisco (Tyr109*) pertenece a la subunidad B. (B) Mapa de densidad electrónica en el entorno del centro activo con las tres moléculas de agua que estabilizan uno de los oxígenos del grupo fosfato de la coenzima PLP.

La orientación del anillo del PLP está determinada por numerosas interacciones polares y no polares. El anillo aromático de la coenzima está estabilizado por una interacción aromática (π - π) con la Phe175 y por una interacción hidrofóbica con la Ile225. El nitrógeno en posición 1 del anillo aromático del PLP (N1) forma un enlace de hidrógeno con el oxígeno de la cadena lateral del Asp253, que se encuentra a una distancia de 2,6 Å. Esta interacción asegura que el N1 aromático esté protonado durante la reacción de transaminación. El grupo fosfato del PLP se encuentra estabilizado por distintos tipos de fuerzas intermoleculares. Por un lado, se forma un puente salino entre la Arg294 y uno de los oxígenos del fosfato a 2,8 Å. Por otro lado, existen tres enlaces de hidrógeno con residuos adyacentes, uno con dicha Arg294 a 2,7 Å, otro con la Ser151 a 1,7 Å y el último con la Tyr109 de la subunidad contraria a 1,8 Å. Además, existen tres puntos de densidad electrónica cercanos a uno de los átomos de oxígeno del fosfato, que probablemente sean moléculas de agua encargadas de la estabilización de dicho átomo, que tiene carga negativa y que de otro modo no podría ser estabilizado por ningún otro residuo del centro activo (Figura 42B). Dichas moléculas de agua se encuentran a una distancia adecuada para la formación de enlaces de hidrógeno (<2,5 Å).

El grupo hidroxilo del anillo de piridina del PLP se encuentra desprotonado y forma enlaces de hidrógeno débiles con la Asn225 ($d=2,8$ Å) y con la Tyr256 ($d=2,0$ Å), actuando en ambos casos el oxígeno como aceptor. Estas interacciones previenen la rotación del anillo piridínico hasta la entrada del aminoácido. En otras aminotransferasas de la subfamilia Iy, estos dos residuos se encuentran estabilizados formando enlaces de hidrógeno con una tirosina adyacente. Sin embargo, en el caso de LiTAT, ésta se encuentra sustituida por una Phe378.

4.7.4 Modificaciones estructurales en el centro activo en el primer paso de transaminación de la tirosina.

Para poder dilucidar la posición adoptada por la molécula PMP en el centro activo del enzima se añadió tirosina en el tampón de cristalización utilizado previamente. Sin embargo no se pudo obtener una estructura con la resolución suficiente para resolver la estructura de este estado de transición.

La esfera de interacción sin el ligando PLP utilizada para los ensayos de acoplamiento molecular con la proteína LiTAT_Tr se representa como una coordenada tridimensional cuyos ejes se localizan en el origen de coordenadas establecido para el N4 de la aldimina interna de PLP unido a la Lys286 (Radio X, Y, Z: 15.56 Å, 9.93 Å, 18.78 Å) (Anexo XI). Para predecir las disposiciones y conformaciones permitidas de los distintos estados de transición se utilizó el algoritmo *CDocker* (apartado 3.14). Por tanto, mediante ensayos de acoplamiento molecular *in silico*, se predijeron las disposiciones adoptadas por los distintos estados de transición que se producen en el primer paso de la reacción de transaminación (Figura 43) a partir de la aldimina interna (Figura 43A). En concreto se llevaron a cabo las simulaciones del estado de transición en el que participa la forma quinonoide de la tirosina unida a la coenzima PLP y del estado de transición en el que interviene el PMP. Para reducir la variabilidad durante el proceso, se restringió a 18,8 Å la esfera de interacción entorno al anillo piridínico del PLP. A continuación, se eliminaron los átomos correspondientes al PLP, dejando la Lys286 libre. El tamaño de la esfera de interacción utilizada fue suficiente para incluir todos los residuos descritos que participan en la estabilización del cofactor e intervienen en la reacción, así como los residuos que forman el canal de entrada al centro activo por el que acceden los sustratos para reaccionar con la coenzima.

Al realizar el acoplamiento molecular del PLP unido a la Tyr en su forma quinonoide, se pudo observar que la única conformación posible adoptada por este intermedio (Figura 43B) requiere una rotación libre entorno al enlace formado entre los átomos C4 del anillo piridínico y C4A de la cadena lateral de la Lys286. Esta rotación no es posible en la forma quinonoide, pero sí se puede producir en la forma resonante cetimina, sobre la que se produce la hidrólisis de la base de *Schiff* para liberar el oxoácido pHPP, resultante de la desaminación de la tirosina. La disposición adoptada por la forma cetimina al realizar el acoplamiento molecular es idéntica a la adoptada en la forma quinonoide.

Tras la hidrólisis del enlace imina y la consecuente liberación del pHPP, la coenzima queda en forma de PMP libre, y sigue estabilizada en el centro activo para poder intervenir en el segundo estado de transición. La disposición del PMP en este estado de transición también fue simulada y, en este caso, se obtuvieron 107 disposiciones posibles, dado el menor impedimento estérico de esta conformación. En este caso se seleccionó la segunda disposición más favorable energéticamente, dado que el valor de RMSD de los átomos del anillo aromático al compararlo con el intermediario quinonoide era el menor de entre todas las posibles (2.36 Å) (Figura 43C). En esta disposición, el enlace covalente entre el C4 del anillo piridínico y el N4A (amina primaria) es perpendicular al plano formado por el anillo aromático del PMP.

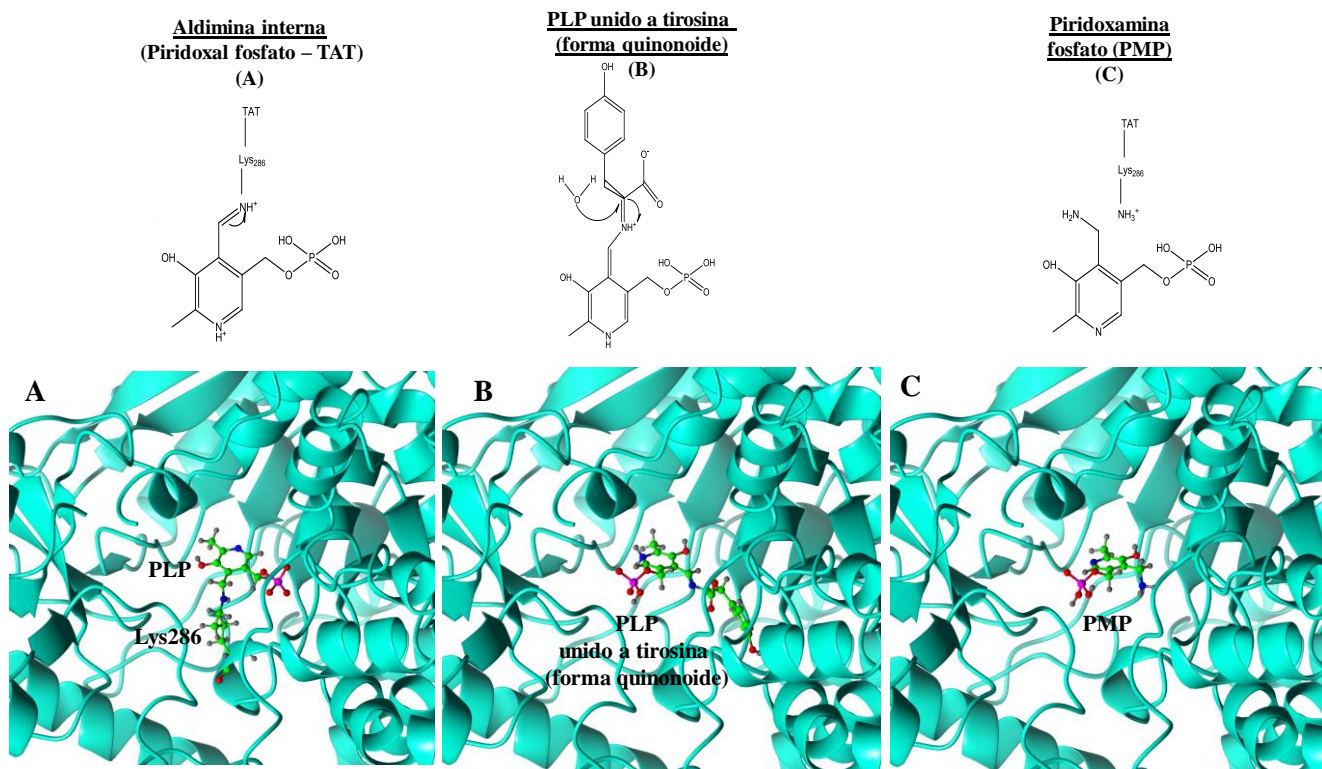


Figura 43. Disposición adoptada por los estados de transición en el centro activo de LiTAT en el paso de transaminación de la tirosina. La estructura secundaria que forma el centro activo de LiTAT se indica en cian en un modelo de α -hélices y láminas β . (A) Disposición adoptada por el cofactor PLP unido covalentemente a la Lys286 (aldimina interna) en la estructura obtenida por cristalografía de rayos X. (B) Modelo de la disposición adoptada por el estado de transición en el que participa el PLP unido a la tirosina en forma quinonoide. (C) Modelo de la disposición adoptada por el estado de transición en el que participa la piridoxamina fosfato (PMP). Los átomos de C, O, N y P se muestran en verde, rojo, azul y magenta respectivamente.

4.7.5. Simulación de la disposición adoptada por los oxoácidos en el segundo paso de la reacción de transaminación.

Los residuos presentes en el canal de acceso al centro activo y que forman parte del dominio de menor tamaño de LiTAT (ver sección 4.4.2.) determinan la orientación que deben adoptar los residuos para reaccionar con la coenzima. Para poder identificar los residuos de la proteína LiTAT que podrían estar participando en la unión de los sustratos, se realizaron estudios de acoplamiento molecular *in silico* con los oxoácidos piruvato, cetometiltiobutirato (KMTB) y α -cetoglutarato, cuya actividad ha sido ensayada *in vitro* (ver apartado 4.4.1.), y se seleccionó en cada caso la disposición energéticamente más favorable.

En la figura 44 se muestran las disposiciones adoptada por cada una de las moléculas ensayadas y que forman el estado de transición de *Michaelis*. Para el ataque nucleofílico de la amina secundaria (N4A) del intermediario PMP sobre el C2 del oxoácido aceptor del grupo amino, se necesita que éste último se encuentre en una posición cercana que facilite dicha reacción. Dado su pequeño tamaño y su bajo impedimento estérico, el piruvato se puede encontrar en una posición adyacente a la amina secundaria a 2,9 Å (Figura 44A). Sin embargo, en el caso del α -cetoglutarato, el C2 sobre el que se produce el ataque nucleofílico se halla a 6 Å y en posición opuesta al N4A del PMP, impidiendo el ataque nucleofílico (Figura 44B). En el caso del oxoácido KMTB, la distancia existente entre el N4A del PMP y el C2 del KMTB es de 3,9 Å, situación intermedia a lo que ocurre con el piruvato y el α -cetoglutarato (Figura 44C), pero que permite la formación de un enlace de hidrógeno entre el N4A del PMP y el C2 del KMTB.

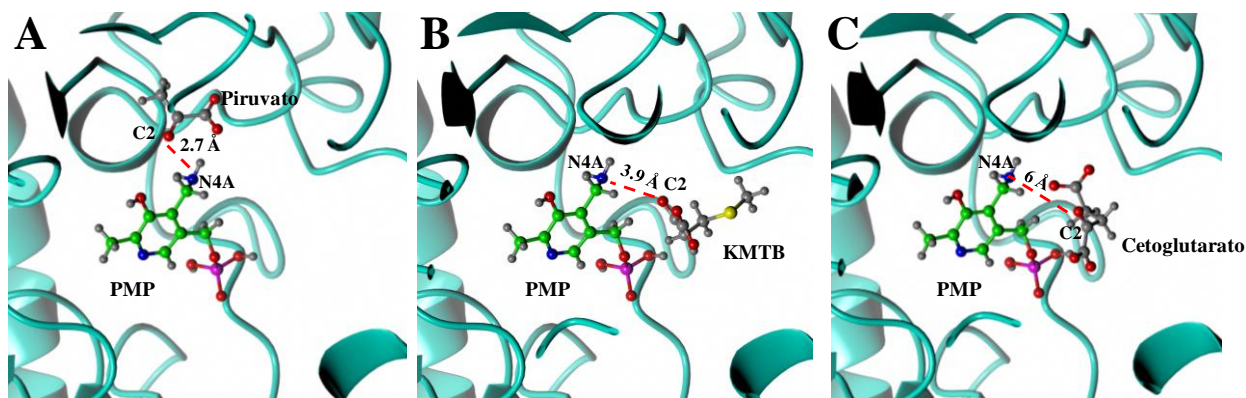


Figura 44. Simulación del estado de transición de Michaelis con distintos oxoácidos. La estructura secundaria que forma el centro activo de LiTAT_Tr se indica en cian en un modelo de α -hélices y láminas β . Los átomos de C, O, N y P se muestran en verde, rojo, azul y magenta respectivamente. (A) Disposición adoptada por el piruvato en el centro activo de la enzima. (B) Disposición adoptada por el cetometiltiobutirato (KMTB) en el centro activo de la enzima. (C) Disposición espacial adoptada por el α -cetoglutarato en el centro activo del enzima.

4.8. Predicción de un grupo farmacóforo de LiTAT.

Se utilizó la disposición adoptada por el oxoácido KMTB en el centro activo de la subunidad A para predecir un grupo farmacóforo en LiTAT, detallando las características que hacen posible esta diferencia (Figura 45). Las características que definen la unión del oxoácido KMTB a la proteína LiTAT_Tr se han utilizado para la generación del grupo farmacóforo. El radio definido de tolerancia para cada una de estas características es de 1,6 Å. Los residuos que participan en el farmacóforo se muestran en la Tabla 10, indicando si el residuo está conservado o no en los ortólogos de TAT en mamíferos y en *T. cruzi*. En el reconocimiento del KMTB participan residuos de la subunidad A (Ser151 y His177) y B (Tyr109 y Ala322). El grupo carboxílico del KMTB se encuentra formando un enlace de hidrógeno con el N3 cargado positivamente del anillo imidazólico de la His177. El carbonilo en posición 2 se dispone orientado hacia la amina primaria del PMP para permitir su reacción. La característica más importante para dicho grupo farmacóforo es la presencia de un grupo metilo en posición 5' que permite la interacción hidrofóbica con la Ala322 de la subunidad B. Por tanto la distancia de cinco átomos entre el grupo carboxílico y el grupo metilo es un requerimiento importante para mantener el grupo farmacóforo.

Tabla 10. Residuos que forman parte del farmacóforo de LiTAT. En verde se indican los residuos conservados entre *L. infantum*, *T. cruzi* y *H. sapiens* y en rojo los no conservados.

<i>L. infantum</i> TAT	<i>T. cruzi</i> TAT	<i>H. sapiens</i> TAT
Tyr109	Tyr71	Tyr109
Ser151	Ser111	Ser145
His177	His140	Leu171
Ala322	Cys289	Leu317

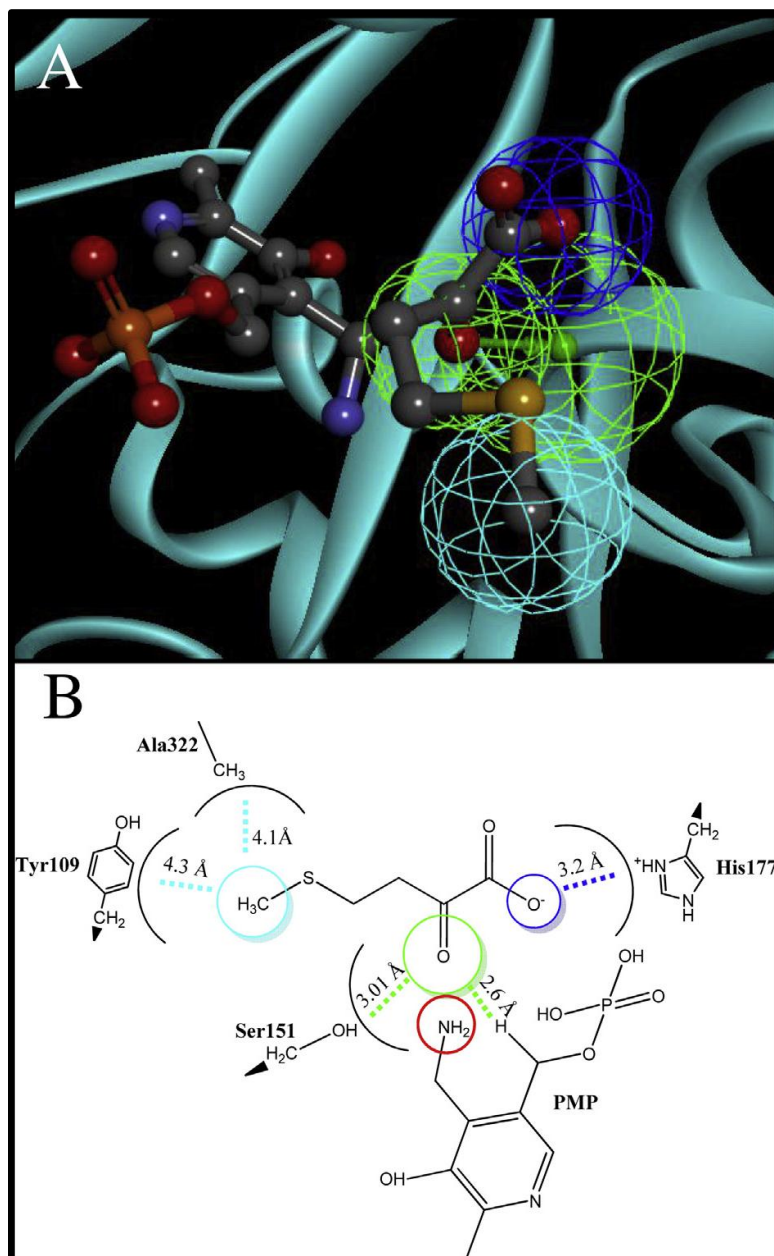


Figura 45. Grupo farmacóforo predicho a partir de la estructura de LiTAT acoplada al sustrato KMTB. (A) Disposición adoptada por KMTB en el canal de acceso al centro activo del enzima, con los grupos funcionales que participan en el farmacóforo señalados con esferas. Los átomos de C, O, N, S y P se muestran en gris, rojo, azul, amarillo y naranja respectivamente. Los enlaces de hidrógeno se muestran en verde, las interacciones hidrofóbicas en azul oscuro y las interacciones electrostáticas en cián. (B) Farmacóforo de LiTAT con los aminoácidos que participan en el reconocimiento del oxoácido KMTB. El grupo carbonilo aceptor de electrones (rodeado en verde) se encuentra dirigido hacia la amina primaria del PMP (rodeado en rojo).

Gracias al grupo farmacóforo generado se pudo identificar la molécula L-metionina etil piruvato (L-MEEP) presente en la base de datos *ChemDB* que cumplía los requerimientos estéricos y electrónicos. Al realizar el acoplamiento *in silico* con LiTAT, esta molécula se dispone bloqueando el canal de acceso de los sustratos al centro activo de la proteína e interaccionando con los residuos que forman parte del farmacóforo predicho (Figura 46). Por otra parte, no se obtuvieron conformaciones posibles al intentar simular el acoplamiento molecular del L-MEEP con el centro activo de la enzima tirosina aminotransferasa de *H. sapiens*.

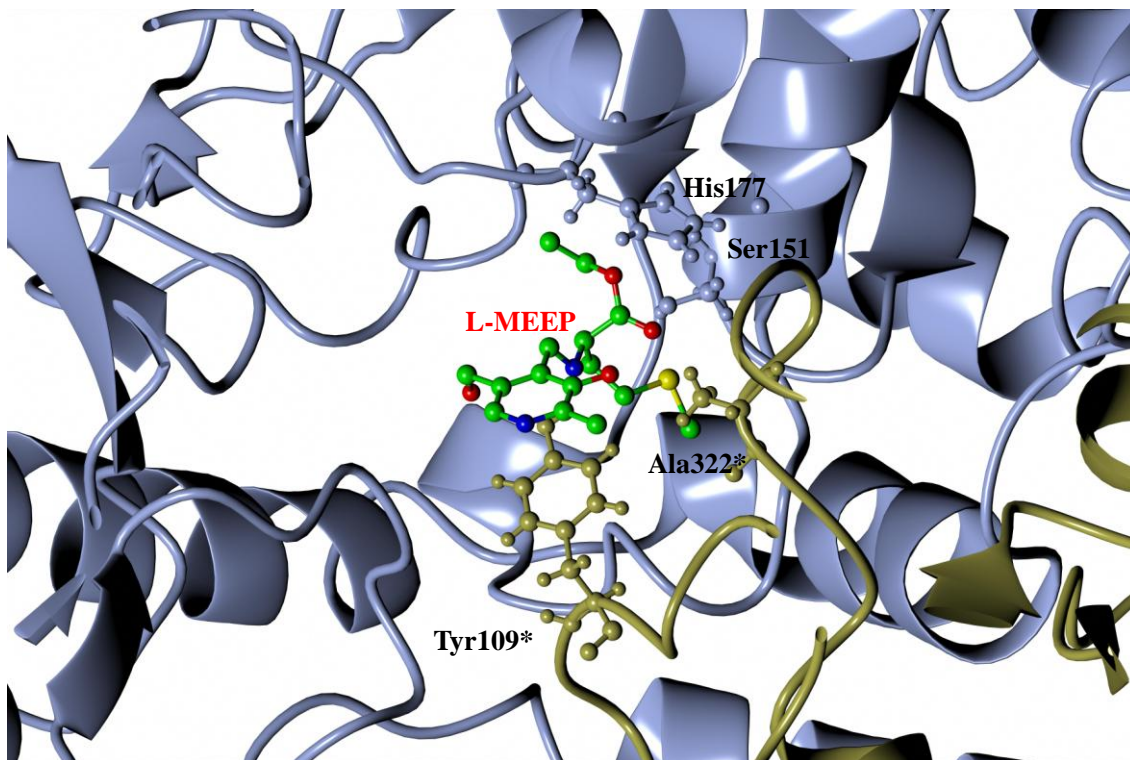


Figura 46. Disposición adoptada por el ácido L-metionina etilpirúvico. La estructura secundaria de LiTAT se indica en azul claro la subunidad A y en marrón la subunidad B en un modelo de α -hélices y láminas β . Los residuos de la subunidad B se señalan con un asterisco. Los átomos de C, O, N y S del L-MEEP se muestran en verde, rojo, azul y amarillo respectivamente.

Discusión

5.1. Expresión y localización subcelular de la tirosina aminotransferasa en *L. infantum* y su regulación.

La proteína LiTAT está regulada en función del estadio en que se encuentre el parásito. La expresión de la proteína alcanza su mayor nivel en promastigotes en fase logarítmica temprana, y no se detecta en fase estacionaria (Figura 18). Este perfil de expresión ha sido confirmado, tanto por *Western blot* como por IFI (Figura 27). La expresión de LiTAT en los promastigotes más infectivos obtenidos a partir del cultivo en fase estacionaria y aislados por dos métodos distintos (apartado 3.2.3.3.), es mayor que en la de los promastigotes con una menor capacidad infectiva, tal y como sucede a nivel de ARNm (Alcolea y col., 2009). La mayor expresión de la proteína en la subpoblación de promastigotes más infectivos podría ser debida a su participación en los mecanismos de resistencia al estrés oxidativo, dado que existe un aumento de su expresión en un aislado de promastigotes resistentes a NO (Figura 20). La expresión de la proteína en amastigotes intracelulares obtenidos a partir de infecciones *in vitro* de células U-937 es menor que la expresión obtenida en amastigotes axénicos, aunque existe expresión detectable de LiTAT en ambos casos (Figura 19). Esto pone de manifiesto las diferencias existentes entre los amastigotes intracelulares y el modelo de amastigotes axénicos, especialmente en proteínas del metabolismo de *Leishmania* (Rochette y col., 2009). La sobre-expresión de la proteína LiTAT en líneas de promastigotes *knock-in* con su secuencia completa y sin el extremo N-terminal de 38 aminoácidos permitió comparar su perfil de expresión con el del cultivo control que sólo expresaba la proteína endógena (Figura 21). Al sobre-expresar la proteína con la secuencia completa no se detecta expresión en fase estacionaria. Sin embargo, al sobre-expresarla sin el extremo N-terminal la expresión se mantiene en fase estacionaria lo que indica que éste es importante en la regulación de la degradación de la proteína. Además dicha porción de la secuencia de la proteína está conservado en todas las TAT del género *Leishmania* y sin embargo está ausente en *T. cruzi* (Figura 12). Además es de una longitud similar al extremo N-terminal presente en las TAT de mamíferos, el cual participa en la regulación de su expresión en hígado vía degradación por proteasoma (Ciechanover y col., 1997, Gross-Mesilaty y col., 1997). Teniendo en cuenta esto, se estudió el efecto que la inhibición del proteasoma podía tener sobre la expresión de LiTAT para poder establecer el mecanismo de degradación de LiTAT. Los resultados observados sugieren que dicha inhibición retrasa la degradación de LiTAT durante las primeras 48 h desde el inicio del cultivo en fase logarítmica temprana (apartado 4.2.4., Figura 22). En LiTAT uno de los aminoácidos del extremo N-terminal, la Lys15, se ha identificado mediante predicción *in silico*, como un posible residuo capaz de ser ubiquitinado. Sin embargo, al comparar el perfil de expresión de LiTAT en promastigotes con el perfil de la proteína ortóloga en *L. donovani* (LdTAT), éste resultó ser distinto. La expresión de LdTAT se mantiene hasta la fase estacionaria, sin embargo, su secuencia de es idéntica a la de LiTAT, incluido el residuo Lys15, excepto en dos residuos que se encuentran sustituidos en *L. infantum* (*L. donovani*-Ala19 x *L. infantum*-Ser19 y *L. donovani*-Ala341x *L. infantum*-Thr341). Tanto la Ser19 como a Thr341 de LiTAT son aminoácidos susceptibles de ser fosforilados y, además, uno de ellos se encuentra en el extremo N-terminal de 38 aminoácidos. Previamente, se ha identificado a la TAT de *L. donovani* como una proteína fosforilada en promastigotes (Morales y col., 2008), lo que sugiere que ésta enzima podría estar fosforilada post-traduccionalmente en otras especies *Leishmania*. Esto justificaría que al inmunoprecipitar LiTAT (Figura 31) se observen dos variantes de la proteína con distinto pI, lo que podría ser el resultado de dos estados de fosforilación diferentes de LiTAT. La fosforilación post-traducciona de proteínas controla la actividad, localización subcelular, degradación e interacción con otras proteínas (Morales y col., 2008). Por tanto, los resultados obtenidos sugieren

que la expresión de LiTAT podría estar regulada post-traduccionalmente a través de un proceso de fosforilación y/o de ubiquitinación.

La expresión de la proteína LiTAT es dependiente de la presencia o ausencia de suero en el medio de cultivo. Por otro lado, en ausencia del suero no se produce la degradación del enzima (Figura 24), probablemente debido a que no se inician los mecanismos de degradación de proteínas, como el proteasoma el cual requiere la presencia de ATP para su activación (Bech-Otschir y col., 2009). De forma complementaria, con objeto de identificar aquellos factores encargados de iniciar la expresión de LiTAT, se utilizó un medio definido en el que se evaluó ésta en ausencia de una serie de nutrientes (Anexo IV) entre los cuales se ha identificado el hierro en su forma biodisponible, la hemina (Figura 26). Esto concuerda con la observación de que la disponibilidad del hierro en el medio disminuye la expresión de ARNm de la TAT en *L. amazonensis* (Mittra y col., 2013). Por lo tanto, podría sugerirse que la regulación del inicio de la expresión de LiTAT esté mediada por los elementos de respuesta al hierro (IREs), a través de su unión con proteínas específicas (IBPs). Además, la baja expresión de LiTAT observada al cultivar promastigotes con SBF sin los factores termolábiles (Figura 26B) podría explicarse por el sistema de captación del hierro libre a través de las proteínas LHR-1 y LIT-1 (Flannery y col., 2011, Miguel y col., 2013).

Por otra parte, en promastigotes en fase logarítmica, la proteína es citoplasmática, al igual que en *T. cruzi* (Cazzulo y cols., 1999). No obstante, la distribución de LiTAT en esta fase de crecimiento no es homogénea, sino que está en unidades discretas principalmente en el bolsillo flagelar (Figura 27). Esto sugiere que LiTAT podría estar asociada a otras proteínas formando un complejo o compartimentalizada. Esto último se descartó mediante separación en gradiente con digitonina, comparando su patrón de solubilización con el de una proteína compartimentalizada (Figura 28). Dicho patrón de distribución de una proteína asociada a otras formando un complejo, ha sido observado también en otros casos en *Leishmania* (Dupe y col., 2015). Además, la probable asociación de LiTAT con otras proteínas concuerda con la presencia en el extremo N-terminal de los motivos de unión a otras proteínas, AXXXA y GXXXG (Kleiger y col., 2002). No obstante, a diferencia de lo que sucede en promastigotes en fase logarítmica, la distribución subcelular de LiTAT en la subpoblación PNA⁻ parece que se encuentra restringida en un solo punto. En otras aminotransferasas de *Leishmania* también se ha observado una localización subcelular distribuida en dos compartimentos (Marciano y col., 2009) como en este caso. Por tanto, ciertas aminotransferasas en *Leishmania* tienen una distribución multicompartmental. Por otro lado, en *Leishmania*, se han descrito casos de algunas proteínas que tienen la capacidad de translocarse transitoriamente desde el citoplasma a otros orgánulos durante la diferenciación de promastigote a amastigote (Dupe y col., 2015) lo que podría estar ocurriendo también en LiTAT. Además, se ha descrito un sistema de compartimentalización glicosomal en tripanosomátidos, como alternativa a la regulación alostérica que se produce en mamíferos en algunas rutas metabólicas como la glucólisis, con el objetivo de prevenir un aumento en la acumulación de intermediarios letales para la célula (Haanstra y col., 2008). Es posible que algo similar esté sucediendo con LiTAT, ya que aunque en promastigotes en fase logarítmica temprana hay una alta expresión de la proteína, en fase estacionaria la proteína no se detecta, excepto en las formas más infectivas, cuya expresión se mantiene en bajos niveles y, posiblemente, de forma compartimentalizada.

En resumen, LiTAT está regulada de una forma compleja. El inicio de la expresión es dependiente del hierro y además los resultados sugieren que la degradación del enzima es dependiente del proteasoma y de la presencia de suero en el cultivo. Además esta degradación parece estar relacionada con la presencia del extremo N-terminal de 38 aminoácidos cuya delección impide parcialmente la desaparición de la proteína en fase estacionaria.

5.2. Función del catabolismo de aminoácidos aromáticos en el metabolismo de *Leishmania*.

En el tubo digestivo del insecto vector se encuentran las proteínas y los aminoácidos obtenidos a partir de la sangre ingerida por el flebotomo, los cuales son usados por los promastigotes como nutrientes. Por otro lado, en el estadio amastigote, al no haber disponibilidad de hidratos de carbono en el interior del fagolisosoma, el parásito utiliza los lípidos y los aminoácidos disponibles para la obtención de energía (Rosenzweig y col., 2008).

La función del catabolismo de aminoácidos aromáticos en el metabolismo de los tripanosomátidos ha sido ampliamente discutida, aunque no existe consenso a la hora de explicar la elevada actividad de transaminación encontrada (Oppenheimer y Coombs, 2007, Nowicki y Cazzulo, 2008). Estudios iniciales desarrollados en *T. brucei* pusieron de manifiesto la relación existente entre la alta tasa de excreción de derivados aromáticos y la patogenia de la enfermedad (Newport y col., 1977, Seed y col., 1983). No obstante, en *T. brucei* no hay un gen ortólogo de TAT, tal y como se indica en el apartado 4.1.1., por lo que dicha función de transaminación de aminoácidos aromáticos se debe llevar a cabo por otras enzimas transaminasas. En el presente estudio, se ha comprobado que existe una elevada tasa de excreción del derivado aromático de la tirosina en *L. infantum*, el pHPL (apartado 4.5.2., Figura 30). Esta excreción de derivados aromáticos en *Leishmania* ha sido confirmada en un estudio reciente en las especies *L. major*, *L. donovani* y *L. mexicana* (Westrop y col., 2015). Por otro lado, la elevada tasa de transaminación de aminoácidos aromáticos, en *T. cruzi* podría ser debida a la necesidad de regenerar el NAD citosólico a través de la reducción del α -oxoácido aromático generado en la transaminación (Nowicki y Cazzulo, 2008). En el presente trabajo se ha corroborado que la enzima LiTAT es capaz de transaminar tirosina con distintos oxoácidos (Tabla 6). Además, se ha comprobado que en el estadio promastigote existe una alta actividad de transaminación de la tirosina y reducción del producto derivado de su transaminación (Tabla 7). Por otro lado, se ha confirmado pHPL es un producto de excreción del metabolismo (Figura 30). La detección de pHPL en el sobrenadante del cultivo de promastigotes en fase estacionaria de *L. infantum*, como producto de excreción, confirma la existencia de una ruta del catabolismo de la tirosina similar en *L. infantum* a la observada en *T. cruzi* y diferente a la observada en mamíferos (Fulenwider y col., 1978).

La transaminación de aminoácidos aromáticos en *Leishmania* spp., se lleva a cabo en todas las fases de crecimiento del cultivo de promastigotes, con un aumento gradual conforme aumenta la densidad celular en el cultivo. No obstante la actividad enzimática específica de transaminación observada de la enzima LiTAT (Tabla 6) es relativamente baja comparada con otros ortólogos de la proteína (Montemartini y col., 1993), y muy similar a la de otras especies de *Leishmania*, como *L. major* (Marciano y col., 2009).

La reacción de deshidrogenación del pHPP a pHPL se lleva a cabo por una o varias deshidrogenasas del tipo L-hidroxiácido (L-HADH). No obstante, la identidad de esta/s enzima/s en tripanosomátidos no está clara (Nowicki y Cazzulo, 2008, Westrop y col., 2015). En este trabajo, se han identificado dos enzimas anotadas en el genoma de *L. infantum* con capacidad de reducir el pHPP: la enzima málica (LiMalDC) y la malato deshidrogenasa citosólica

(LicMDH) (Tabla 8). La enzima LiD2-HADH, propuesta como un posible candidato para ser la enzima L-HADH que reduce los α -oxoácidos aromáticos (Alcolea y col., 2009), no mostró actividad deshidrogenasa con los sustratos utilizados (Tabla 8), por lo que se descartó que pudiera estar participando en la ruta del catabolismo de aminoácidos aromáticos. No obstante, dado el requerimiento de NADH para solubilizar esta proteína para su purificación (Figura 33A) y la presencia en su secuencia de aminoácidos del plegamiento *Rossmann* específico de deshidrogenasas entre los aminoácidos 110 y 298, se trata de una deshidrogenasa de función y especificidad aún desconocida. La enzima LicMDH es capaz de reducir pHPPH a pHPL. Esta proteína es la que tiene una mayor identidad de secuencia en *Leishmania* (60%) con la L-HAD aislada en *T. cruzi* con capacidad para reducir α -oxoácidos aromáticos a los correspondientes α -hidroxiácidos (Montemartini y cols., 1994). Por otro lado, la enzima LiMalDC podría ser una buena candidata para llevar a cabo la función de reducir el pHPP en pHPL en el parásito, ya que por un lado parece estar interaccionando con LiTAT en promastigotes en fase logarítmica (Figura 31) y por otro lado es capaz de reducir los α -oxoácidos resultantes de la transaminación de aminoácidos aromáticos (Tabla 8). Ambas enzimas son principalmente citosólicas y se expresan en promastigotes en fase logarítmica con una alta expresión relativa (Figuras 18, 34 y 37).

En este estudio, se ha descrito la capacidad de LiMalDC y LicMDH de reducir oxoácidos mono- y dicarboxílicos aromáticos y no aromáticos, aunque lo hacen con distintas coenzimas. La máxima actividad enzimática observada se alcanza en ambos casos con piruvato, probablemente debido a la ausencia de impedimentos estéricos para el desarrollo de la reacción (Tabla 6). Por un lado, LicMDH es capaz de reducir sustratos con NADH pero no con NADPH, al igual que ocurre en la L-HADH de *T. cruzi* (Nowicki y cols., 1994). Por otro lado, la enzima LiMalDC es capaz de reducir todos los oxoácidos analizados al igual que LicMDH, pero para el desarrollo de su actividad requiere NADPH en lugar de NADH como coenzima, como sucede con la enzima málica citosólica humana (Loeber y col., 1994). Esta especificidad de LiMalDC con el NADPH se ha observado también en *L. donovani* (Saadalla y Rassam, 1987). La obtención de un modelo por homología de la enzima LiMalDC permitió identificar uno de los posibles residuos responsables de esta especificidad, la Lys356 (Figura 38A). De acuerdo a los estudios realizados de acoplamiento molecular *in silico*, la cadena lateral de este residuo forma un enlace de hidrógeno con uno de los oxígenos del grupo fosfato del NADPH, lo que permite el acoplamiento del coenzima al plegamiento de *Rossmann* (Figura 38A). El alineamiento de la secuencia de LiMalDC con el de la enzima málica humana permitió comprobar que la Lys356, encargada de formar un enlace de hidrógeno con los átomos de oxígeno del fosfato del NADPH, se encuentra dentro de un inserto en la secuencia de la proteína específico del género *Leishmania* que no se encuentra en la proteína humana. Este residuo permite la unión específica al NADPH lo que no sucede con otras deshidrogenasas dependientes de NADH. Tal es el caso de LicMDH en la que la Lys que une el NADPH está sustituido por un residuo de glutamina que impide el acoplamiento del NADPH en el plegamiento de *Rossmann* (Hsieh y col., 2006).

Además al simular la disposición adoptada por el oxoácido pHPP en el centro activo de la enzima, se pudo comprobar que éste se sitúa en una posición adyacente al NADPH, a los residuos Tyr107 y Lys177 y al catión Mn^{2+} (Figura 38B), todos ellos esenciales para que la reacción de reducción del pHPP tenga lugar.

En resumen, el estudio de la enzima LiMalDC ha permitido comprobar que es capaz de reducir α -oxoácidos aromáticos utilizando NADPH, pero no NADH, lo que sugiere que podría existir una relación directa entre el

catabolismo de aminoácidos aromáticos y la reoxidación del NADPH citosólico, el cual es necesario, entre otras funciones, para disminuir el daño oxidativo producido en la célula por compuestos como el NO (Rios y col., 2015). Además, LiTAT se encuentra sobre-expresada en cepas resistentes a óxido nítrico (Figuras 19) y en las formas infectivas de *L. infantum* como se ha explicado anteriormente. También se ha observado que en cepas de *T. cruzi* resistentes a benznidazol, el cual induce la producción de radicales libres tóxicos para la célula, el gen codificante para TcTAT se sobre-expresaba a nivel de ARNm. Sin embargo, en este caso dicha sobreexpresión no se correspondía con un aumento en la expresión de la proteína (Rego y col., 2008).

En conjunto estos resultados sugieren que LiTAT podría tener una función relevante en el establecimiento de la infección en el hospedador a través de la regeneración del NADPH por la enzima LiMalDC en una ruta metabólica en dos pasos.

5.3. Relación estructura-función de LiTAT.

En las especies del género *Leishmania*, se ha anotado en el genoma un único gen que codifica la enzima TAT (Peacock y col., 2007). Hasta el momento, dentro del género *Leishmania* spp., sólo se había confirmado la actividad tirosina aminotransferasa en la TAT de *L. major* (Marciano y col., 2009). En *T. cruzi*, cuyo ciclo biológico al igual que en *Leishmania* presenta un estadio intracelular amastigote, hay 12 genes anotados como TAT, de los que, al menos cuatro no parecen codificar aminotransferasas, dada la ausencia del residuo catalítico lisina en su secuencia de aminoácidos, que es imprescindible para unirse a PLP (Anexo I) (El-Sayed y cols., 2005). En el caso de *T. brucei* no hay genes anotados como TAT. No obstante, en esta especie se ha descrito que existe una alta tasa de transaminación de aminoácidos aromáticos (Seed y cols., 1973), por lo que es probable que ésta se lleve a cabo por otra/s enzima/s (El-Sayed y col., 2005).

En el alineamiento de la secuencia de la enzima LiTAT con sus ortólogos en otras especies (Figuras 12 y 13), se observa que la mayoría de los residuos que participan en la estabilización del centro activo están conservados, lo que lleva a que la disposición espacial de la coenzima unida a la Lys286, sea muy similar en todas las especies (Blankenfeldt y col., 1999, Mehre y col., 2010). No obstante, los residuos que participan en el reconocimiento de sustratos no están conservados en LiTAT. Dichos residuos son la Asn17 y la Gln20 de TcTAT y los correspondientes en mamíferos, Asn54 y Arg57, y parecen ser indispensables para el reconocimiento de sustratos dicarboxílicos, como el α -cetoglutarato (Sobrado y col., 2003). La ausencia de dichos residuos en LiTAT es la causa más probable de que la enzima no presente actividad alanina aminotransferasa como ya se ha propuesto previamente (Marciano y col., 2009), a diferencia de lo que sucede en las TAT de mamíferos y en *T. cruzi* (Mehre y col., 2010). En la figura 47, se muestra que la disposición adoptada por los residuos Gln55 de la enzima de *L. infantum* y Asn 17 de la enzima de *T. cruzi*. Mientras que en el caso de TcTAT la cadena lateral del residuo Asn17 se dirige hacia el canal de entrada de los sustratos para permitir su interacción con los mismos, en el caso de LiTAT la cadena lateral de la Gln55 se orienta hacia el lado opuesto del canal, haciendo imposible que se forme un enlace de hidrógeno con el grupo carboxílico del oxoácido para que éste se pueda transaminar.

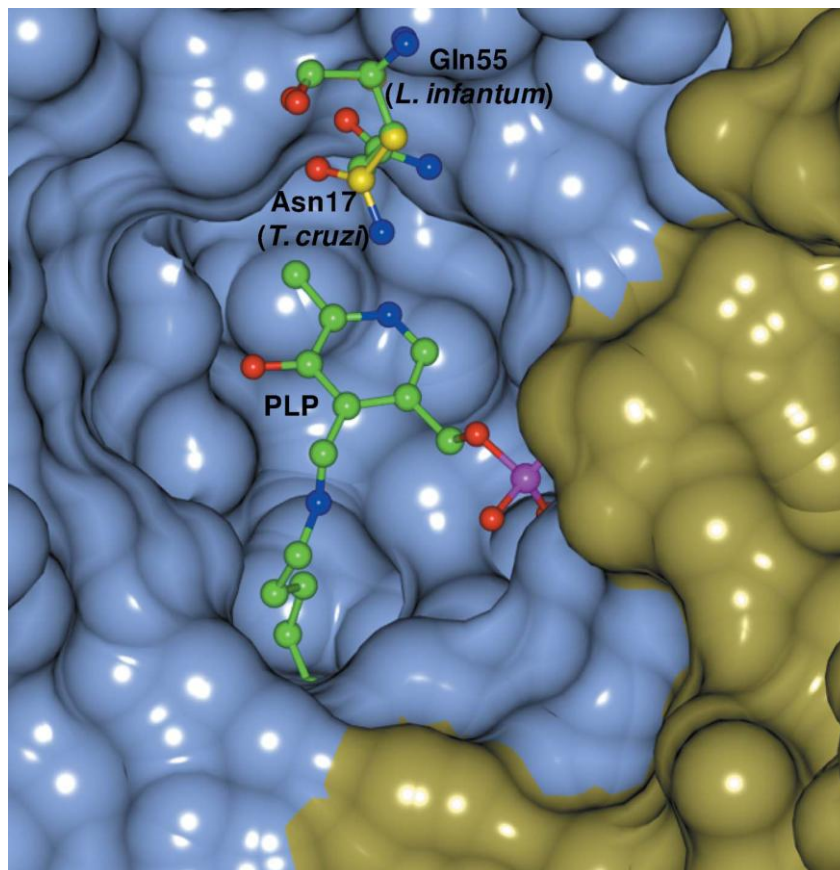


Figura 47. Disposición adoptada por los residuos Gln55 de LiTAT y Asn17 de TcTAT. Las subunidades A y B se muestran en un modelo de superficie en azul y amarillo respectivamente. Los residuos señalados y la coenzima se muestran en un modelo de varillas y esferas. Los átomos de C en LiTAT se muestran en verde y en TcTAT en amarillo. Los átomos de O, N y P se muestran en rojo, azul y magenta respectivamente. Los átomos de H no están representados.

Como ya se ha mencionado anteriormente, la diferencia más notable al comparar las secuencias de LiTAT con la TAT de *T. cruzi* es la presencia en el extremo N-terminal de 38 aminoácidos adicionales en el caso de *Leishmania*. Para evaluar la función de dicho extremo se purificaron ambas versiones de la proteína (con y sin N-terminal) y se comprobó que su delección no afecta a la estructura general de la proteína, a su estabilidad térmica ni a su actividad enzimática (Figura 17, Tabla 6). Sin embargo, ambas proteínas recombinantes (con y sin extremo N-terminal) parecen tener cierta tendencia a desdimerizarse en solución (Figura 16). Mientras que en la enzima de *L. infantum* la conformación nativa de la proteína es inestable por encima de los 60 °C, en la TAT de mamíferos el rango de temperaturas de máxima actividad es entre 55-70 °C (Mehere y col., 2010). En un estudio previo de la TAT de ratón, también se deleccionaron los aminoácidos del extremo N-terminal, ya que estos, como en el caso de LiTAT, se encontraban desordenados y tampoco afectaba a la estabilidad térmica o la conformación dimérica de la proteína (Sobrado y cols., 2003). Sin embargo, a diferencia de la TAT de ratón, cuyo pH óptimo de transaminación es 7,0, LiTAT presenta un pH óptimo de 9,0 para llevar a cabo su actividad enzimática (Figura 29). Además, el rango de pH óptimo de ésta enzima es más amplio que el de la TAT de mamífero. No obstante, el pH de cristalización fue 8,5 al cual todos los tioles se encuentran reducidos sin formar puentes disulfuro. Mientras que en la TAT de mamíferos existe un puente disulfuro cuya reducción es responsable de la inactivación de la enzima (Hargrove y Wichman, 1987, Mehere y col., 2010), en el caso de LiTAT se descarta que exista un mecanismo de inactivación similar ya que todos los tioles están reducidos.

El centro activo con la coenzima PLP de cada subunidad de las todas las tirosina aminotransferasas se encuentra en la interfaz dimérica y la unión de la coenzima es necesaria para estabilizar el plegamiento (Blankenfeldt y col., 1999). Para la estabilización de la coenzima en LiTAT, se requiere la participación de residuos de ambas subunidades (Figura 42), por lo que la desdimerización inactiva a la enzima. A pesar de que la mayoría de las aminotransferasas descritas presentan una estructura cuaternaria homodimérica, existen algunos casos descritos de TATs en solución con otros estados oligoméricos (Yoshikane y col., 2006, Yoshikane y col., 2008). Por tanto, se analizaron los posibles estados oligoméricos de LiTAT también en solución, identificando el dímero como la única forma oligomérica (Figura 15).

La estructura tridimensional de LiTAT no presenta diferencias topológicas relevantes al compararla con otras aminotransferasas de las subfamilias Ia y Iy, siendo la estructura general un homodímero en el que cada subunidad está unido a un residuo catalítico de Lys. Esta estructura es muy similar a la de TcTAT, con algunas diferencias que se detallan a continuación (Figura 48). Entre las posiciones 270 y 276 existe un inserto en TcTAT, y en la TAT de mamíferos que no se encuentra en LiTAT, y que forma un *loop* en la superficie de la proteína que, sin embargo, no parece afectar a la estructura general de la proteína (Figura 41). La orientación y disposición espacial del anillo aromático y del grupo fosfato del PLP es muy similar a la encontrada en TcTAT y en la TAT de mamíferos (Nowicki y col., 2001, Mehere y col., 2010). Además, las tres moléculas de agua que ayudan a estabilizar uno de los grupos cargados negativamente del fosfato de la coenzima y que fueron identificadas en el mapa de densidad electrónica (Figura 42B), también se han identificado en TcTAT (Blankenfeldt y col., 1999). Para llevar a cabo el ataque nucleofílico del aminoácido entrante, la aldimina interna (PLP unido a Lys286) necesita estar protonada y normalmente su pKa es inferior a 7, relativamente bajo comparado con otras bases de *Schiff* en solución ya que la aldimina interna se encuentra muy estabilizada por los residuos adyacentes a la proteína (Iwasaki y col., 1994). En LiTAT, la aldimina interna no esté protonada a pH 8,5 (el pH utilizado en la cristalización) ya que el ángulo de torsión χ_4 de la cadena lateral de Lys253 es de 4 ° al igual que TcTAT (Blankenfeldt y col., 1999), por lo que su pKa es inferior a dicho pH. Para el desarrollo de la transaminación en las aminotransferasas es necesario que el pKa de la aldimina interna se aumente por encima de dos unidades, y esto parece que sólo se consigue mediante la formación de un puente salino entre un residuo de Arg adyacente y el carboxilato del sustrato dicarboxílico (Hayashi y col., 1998). Sin embargo, como se ha indicado anteriormente, LiTAT no es capaz de reaccionar con sustratos dicarboxílicos debido a que no dispone de los residuos necesarios para su unión (Asn y Gln), por lo que el hidrógeno de la aldimina interna debe estar estabilizado de otra forma durante el transcurso de la reacción. Una posible explicación es la formación de un enlace de hidrógeno intramolecular entre el oxígeno fenólico del PLP y la aldimina interna en LiTAT que incrementaría el pKa de la aldimina interna y ayudaría a explicar que la enzima necesite un pH elevado para poder transaminar (Figura 29). En la enzima de *T. cruzi*, los residuos que forman un enlace de hidrógeno con el oxígeno fenólico de la coenzima (Tyr219 y Asn188) se encuentran estabilizados formando un enlace de hidrógeno con la Tyr345 adyacente. Sin embargo, en el caso de la enzima de *Leishmania*, la Tyr345 está sustituida por Phe378 lo que hace que la aldimina interna no se pueda estabilizar por el mecanismo tradicional propuesto para las aminotransferasas (Kirsch y col., 1984). Estos datos además, contradicen la hipótesis de que todas las TATs deben presentar una Tyr345 en lugar de una Phe (Blankenfeldt y col., 1999).

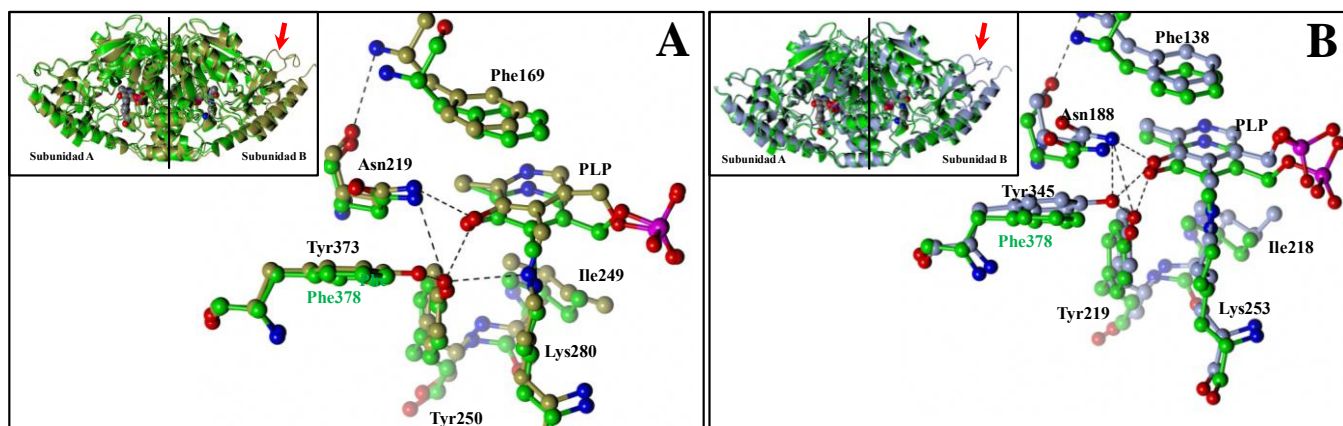


Figura 48. Comparación de la estructura y el centro activo de la tirosina aminotransferasa de *L. infantum* con los ortólogos en *H. sapiens* y *T. cruzi*. (A) Alineamiento estructural y del centro activo de LiTAT (en verde) con el ortólogo en *H. sapiens* (en amarillo). El loop ausente en la estructura de LiTAT se señala con una flecha roja. (B) Alineamiento estructural y del centro activo de LiTAT (en verde) con el ortólogo en *T. cruzi* (en azul). El loop ausente en la estructura de LiTAT se señala con una flecha roja. Los átomos de O, N y P se muestran en rojo, azul y magenta respectivamente.

5.3.1. Estudio de la reacción de transaminación en LiTAT mediante simulación por acoplamiento molecular.

El conocimiento de la estructura del centro activo de la enzima LiTAT ha permitido detectar diferencias estructurales, que se reflejan en diferencias funcionales, entre la enzima de *L. infantum* y las de mamíferos y de *T. cruzi*. Para ello se llevaron a cabo ensayos de acoplamiento molecular *in silico* para identificar las diferencias entre las mismas. Esto permitió conocer las posiciones permitidas que podrían adoptar la piridoxamina fosfato y su inmediato precursor (la aldimina externa formada entre el PLP y la tirosina) en el centro activo de la enzima.

Al realizar la simulación del acoplamiento molecular del complejo PLP-tirosina (como aldimina externa) en LiTAT, la única conformación permitida del complejo requería un giro en torno al enlace C4-C4' manteniendo el anillo aromático coplanar. Este movimiento requeriría importantes cambios conformacionales en el centro activo del enzima y el paso de la conformación abierta a la conformación cerrada en la que el dominio pequeño se acerca al dominio grande (Figura 49). En las aminotransferasas existen estos dos tipos de conformaciones principales (Jager y col., 1994) y el paso de una a otra parece estar mediada por la unión del aminoácido en el centro activo y conlleva grandes cambios conformacionales (Kasper y col., 1996).

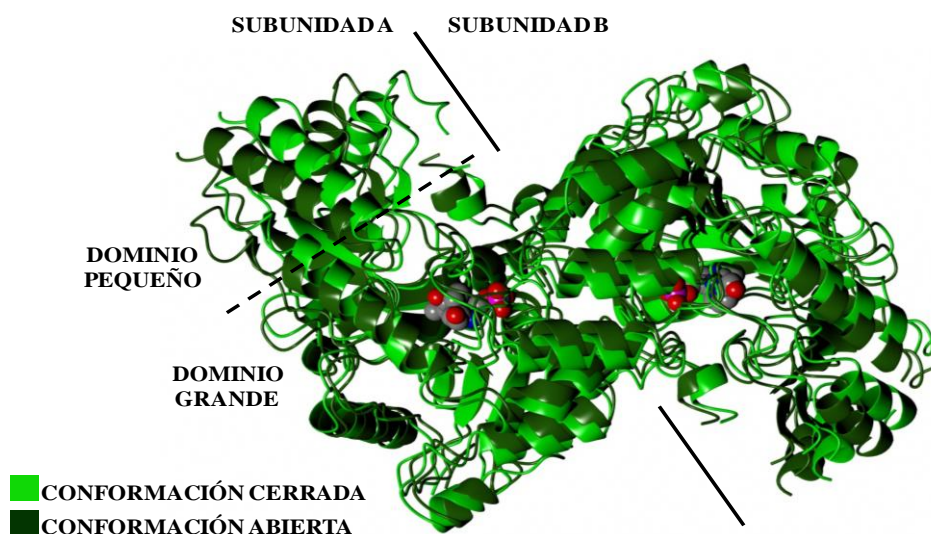


Figura 49. Estados conformacionales abierto y cerrado de la tirosina aminotransferasa de *L. infantum*.

Los átomos de C, O, N y P se muestran en gris, rojo, azul y magenta respectivamente.

De este modo se pudo comparar la actividad enzimática de distintos α -oxoácidos con su disposición adoptada en el centro activo del enzima. El presente estudio se ha centrado en la caracterización de la actividad enzimática de LiTAT con dichos sustratos que la especificidad de esta enzima con los ortólogos de mamíferos es muy distinta, al contrario de lo que sucede con los aminoácidos (Mehere y col., 2010). La actividad enzimática de LiTAT es muy similar a la observada en la TAT de *L. major*. En ambas enzimas la máxima actividad enzimática se produce al utilizar piruvato como sustrato aminoceptor. Sin embargo, no se encontró actividad con sustratos dicarboxílicos como el α -cetoglutarato.

LiTAT es capaz de catalizar la transaminación del oxoácido KMTB, el precursor inmediato de la metionina, pero no así la TAT de mamíferos. Por lo tanto, esta enzima podría ser la responsable del último paso en el ciclo de la regeneración de la metionina en *Leishmania* spp. Esta ruta es muy importante especialmente en las fases de proliferación celular, ya que el producto S-adenosil metionina es uno de los principales agentes alquilantes en las reacciones de *trans*-metilación para la biosíntesis de poliaminas (Sufrin y col., 1995). Estudios previos en tripanosomátidos y en otros protozoos parásitos como *Plasmodium falciparum* han descrito que esta función la llevan a cabo las enzimas aspartato aminotransferasas (Berger y col., 1996, Berger y col., 2001). La importancia de esta ruta metabólica ha permitido el desarrollo de una familia de compuestos inhibidores derivados de la 5-metiltoadenosina frente a *T. brucei* (Goldberg y col., 1998, Bacchi y col., 1999).

La simulación de la disposición adoptada por los oxoácidos utilizados en los ensayos de actividad con LiTAT (entre ellos el KMTB) en el canal de acceso al centro activo (apartado 4.4.5.) permitió identificar los residuos que participan en la selectividad específica frente a cada uno de ellos (Tabla 10). Con las conformaciones observadas, el piruvato se dispone en el interior del centro activo, mientras que los oxoácidos α -cetoglutarato y KMTB se encuentran en el canal de entrada al centro activo asociados a residuos que forman parte del mismo, de acuerdo con el modelo generado (Figura 44B). Sin embargo, la distancia entre el grupo amino que se transfiere desde la piridoxamina fosfato al grupo C2 aceptor del oxoácido es mayor en el caso del α -cetoglutarato, disponiéndose a una distancia que impide la formación del enlace de hidrógeno entre ambos como paso previo a la transposición (Figura 44C), lo que explicaría la baja actividad enzimática que muestra LiTAT con este α -oxoácido dicarboxílico.

5.4. Aplicaciones de la LiTAT en la búsqueda de nuevas estrategias para el control de la leishmaniasis.

5.4.1. Evaluación de la respuesta protectora inducida por LiTAT en el modelo de ratón frente a la infección experimental por *L. infantum*.

El uso de vacunas recombinantes frente a la infección por *Leishmania* presenta una serie de ventajas frente a las vacunas convencionales con organismos vivos o atenuados como su mejor perfil de seguridad y la facilidad de estandarizar los lotes de producción (Bethony y col., 2011). Además, la mejora en la obtención de proteínas recombinantes purificadas, utilizando sistemas de expresión génica, disminuyen los costos de producción a gran escala. No obstante, como paso previo al desarrollo de una vacuna recombinante, es importante identificar aquellos antígenos que estimulan una respuesta protectora en otros modelos animales.

Para el desarrollo de una vacuna es muy importante evaluar la respuesta protectora que tienen aquellas proteínas con una baja identidad de secuencia con los ortólogos en mamíferos. La enzima LiTAT presenta una alta

identidad de secuencia en todas las especies del género *Leishmania* (superior al 80%) pero una baja identidad de secuencia (inferior al 40%) con la TAT de mamíferos. Esto hace que LiTAT sea una buena candidata para utilizarla como antígeno en el diseño futuro de una vacuna contra la leishmaniasis. Sin embargo, como paso previo es recomendable utilizar el modelo de ratón debido a la reproducibilidad en las infecciones, especialmente en la cepa BALB/C (Gupta, 2011). La utilización del modelo de ratón como paso previo para evaluar la respuesta protectora frente a la infección con *Leishmania* con una vacuna de ADN vía intranasal con el antígeno LACK (Gonzalo y col., 2001, Gonzalo y col., 2002, Pinto y col., 2004, Gomes y col., 2007) ha permitido identificar a éste como una proteína capaz de inducir una respuesta protectora en perro (Ramos y cols., 2008; Ramos y cols., 2009). En este caso la vacunación con el plásmido portador del gen LACK retardaba el establecimiento de la infección y se reducía la carga parasitaria en el modelo de ratón transcurridos tres meses desde la infección (Pinto y col., 2004). En el caso de la inmunización con LiTAT, los datos muestran que, a pesar de no ser estadísticamente significativos, el grupo de ratones inmunizados con LiTAT presenta una carga parasitaria en bazo inferior a la registrada en el grupo control positivo (Figura 39). Por consiguiente, en el modelo de ratón, la inoculación de LiTAT protege parcialmente frente a la infección experimental con *L. infantum*. No obstante, es importante tener en cuenta que en el modelo de ratón la respuesta protectora frente a la infección con *L. infantum* es diferente a la observada en humano o en el modelo de perro. Por tanto, en el futuro será necesario desarrollar nuevos experimentos en el modelo de perro para poder evaluar si la inoculación de LiTAT reproduce la respuesta protectora observada en el modelo de ratón, y a su vez poder analizar la respuesta inmunitaria producida tras la infección con *L. infantum*.

5.4.2. Diseño racional de inhibidores que bloquean el centro activo de LiTAT.

Con el aumento de cepas de *Leishmania* spp. resistentes a la terapia de primera línea, la identificación y caracterización de proteínas que puedan ser posibles dianas terapéuticas y la resolución de su estructura para el diseño de fármacos, se ha convertido en una estrategia útil para encontrar nuevos farmacóforos que permitan diseñar inhibidores de molécula pequeña (*small molecules*) (Waugh y col., 2014, Brindisi y col., 2015) o incluso péptidos que promuevan la disociación entre subunidades (Toro y col., 2013).

Debido a las diferencias encontradas en la especificidad de LiTAT frente a los sustratos oxoácidos se generó un grupo farmacóforo específico de LiTAT utilizando la disposición adoptada por el KMTB en el canal de entrada de la misma. De los cuatro residuos que participan en el reconocimiento de KMTB, dos se conservan en la TAT de mamíferos, y los otros dos son distintos, lo que hace de este grupo farmacóforo un buen punto de partida para el desarrollo de nuevos compuestos inhibidores. El compuesto L-MEEP, que había sido utilizado previamente como agente citotóxico específico frente a células proliferativas tumorales (Quash y col., 2004), cumple con las características del farmacóforo generado. Al ensayar el acoplamiento de dicho compuesto al canal de acceso del centro activo de LiTAT, éste se situaba interaccionando con los residuos que participan en el reconocimiento del oxoácido KMTB (Figura 44). Además, a pesar de los intentos realizados de acoplar molecularmente el L-MEEP en el centro activo de la TAT de *H. sapiens*, no se pudo encontrar ninguna disposición energéticamente favorable *in silico*.

La TAT de *L. infantum* es una proteína que se expresa en las formas infectivas del parásito (promastigotes metacíclicos y amastigotes) y su posible participación en los mecanismos de resistencia al estrés oxidativo hacen de ella un buen candidato para el desarrollo de moléculas inhibidoras de su actividad. Además, la regulación específica de la expresión de la proteína resalta la importancia de ésta en el metabolismo del parásito. Finalmente, la resolución de la estructura de la proteína ha permitido identificar aquellas características que diferencian a la TAT de *Leishmania* de las tirosina aminotransferasas de mamíferos, lo que permitirá el diseño de nuevas moléculas que bloqueen la actividad del enzima y su participación en el metabolismo del parásito.

6

Conclusiones

1. La tirosina aminotransferasa de *L. infantum* se expresa en las formas infectivas del parásito (amastigotes y promastigotes metacíclicos) y se sobre-expresa en promastigotes resistentes a óxido nítrico. Los máximos niveles de expresión relativa de la proteína se observan en promastigotes en fase logarítmica temprana de cultivo axénico.
2. El hierro es un nutriente necesario para el inicio de la expresión de la tirosina aminotransferasa en promastigotes de *L. infantum* en cultivo.
3. La ausencia de suero en el medio de cultivo, la inhibición de la actividad del proteasoma y la delección del extremo N-terminal de 38 aminoácidos evitan total o parcialmente la degradación de la tirosina aminotransferasa de *L. infantum*.
4. La localización subcelular de la tirosina aminotransferasa de *L. infantum* es citoplasmática en acúmulos alrededor del bolsillo flagelar en fase logarítmica y probablemente, compartimentalizada en promastigotes metacíclicos.
5. Los promastigotes de *L. infantum* en cultivo excretan el producto final de la reacción de transaminación de la tirosina, el ácido *p*-hidroxifenil láctico.
6. Se ha confirmado la capacidad de la enzima tirosina aminotransferasa de *L. infantum* de transaminar piruvato y α -cetometiltiobutirato utilizando tirosina como aminodonador. La enzima no es capaz de reaccionar con los sustratos dicarboxílicos α -cetoglutarato y oxalacetato.
7. La enzima málica de *L. infantum* interacciona con LiTAT y es capaz de deshidrogenar el *p*-hidroxifenilpiruvato utilizando NADPH como coenzima.
8. La administración de LiTAT en la infección experimental de *L. infantum* en el modelo de ratón induce la disminución de la carga parasitaria en bazo.
9. Se ha resuelto la estructura de la tirosina aminotransferasa de *L. infantum* unida a la coenzima PLP a una resolución de 2.35 Å. La proteína presenta una estructura homodimérica en la que cada subunidad está formada por un dominio mayor con una estructura tipo $\alpha/\beta/\alpha$ y un dominio menor formado por los extremos N- y C-terminal. Cada monómero dispone de una molécula de PLP unida de forma covalente al residuo catalítico Lys286 y se encuentra en la interfaz dimérica.
10. Mediante una aproximación *in silico*, se ha diseñado un farmacóforo específico para bloquear la proteína LiTAT utilizando la disposición espacial adoptada por el sustrato α -cetometiltiobutirato en el centro activo del enzima. Esto ha llevado a la identificación del compuesto L-metionin-etilpiruvato como un posible inhibidor específico de la TAT de *L. infantum*.

1. Tyrosine aminotransferase from *L. infantum* is expressed in the infective forms of the parasite (amastigotes and metacyclic promastigotes) and it is over-expressed in promastigotes resistant to nitric oxide. The maximum levels of relative expression are observed in early-logarithmic promastigotes in axenic culture.
2. Iron is a nutrient required for initiation of the expression of tyrosine aminotransferase in *L. infantum* promastigotes.
3. Serum depletion from the culture medium, inhibition of the 26S subunit of the proteasome and deletion of the first 38 amino acids of the N-terminus avoid, partially or totally the degradation of tyrosine aminotransferase from *L. infantum*.
4. The subcellular localization of tyrosine aminotransferase from *L. infantum* is cytoplasmic in aggregates surrounding the flagellar pocket in logarithmic stage and it is probably compartmentalized in metacyclic promastigotes.
5. *L. infantum* promastigotes excrete the end-product of the tyrosine transamination pathway, the *p*-hydroxyphenyl lactic acid.
6. The ability of tyrosine aminotransferase to transaminate pyruvate and α -ketomethyl thiobutyrate with tyrosine as the aminodonor partner has been confirmed. The enzyme is not able to transaminate dicarboxylic substrates as α -ketoglutarate or oxalacetate.
7. The malic enzyme from *L. infantum* interacts with LiTAT and is able to dehydrogenate the *p*-hydroxyphenyl pyruvic acid using NADPH as coenzyme.
8. The administration of LiTAT in the experimental infection with *L. infantum* in the mouse model, lead to a decrease of the parasite burden in spleen.
9. The structure of tyrosine aminotransferase from *L. infantum* bonded to the coenzyme pyridoxal phosphate has been solved at 2.35 Å. The protein displays an homodimeric structure in which each subunit has a major domain with an $\alpha/\beta/\alpha$ structure and a minor domain formed by N- and C-terminal ends. Each monomer is covalently bonded through its catalytic residue Lys286 to a PLP molecule located at the interface of the homodimer.
10. A specific pharmacophore has been designed using the spatial disposition adopted by the substrate α -ketomethyl thiobutyrate in the active center of the enzyme. This led to the identification of the compound L-methionine-ethyl pyruvate as a feasible specific inhibitor of tyrosine aminotransferase from *L. infantum*.

Bibliografía

- Aagaard-Hansen J, Nombela N, Alvar J. **Population movement: a key factor in the epidemiology of neglected tropical diseases.** Trop Med Int Health. 2010 Nov;15(11):1281-1288.
- Adams PD, Afonine PV, Bunkoczi G, Chen VB, Davis IW, Echols N., y col. **PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution.** Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 2010 Feb;66(Pt 2):213-221.
- Agostinelli E, Marques MP, Calheiros R, Gil FP, Tempera G, Viceconte N., y col. **Polyamines: fundamental characters in chemistry and biology.** Amino Acids. 2010 Feb;38(2):393-403.
- Ajdary S, Alimohammadian MH, Eslami MB, Kemp K, Kharazmi A. **Comparison of the immune profile of nonhealing cutaneous Leishmaniasis patients with those with active lesions and those who have recovered from infection.** Infect Immun. 2000 Apr;68(4):1760-1764.
- Alcolea PJ, Alonso A, Garcia-Tabares F, Torano A, Larraga V. **An Insight into the proteome of Crithidia fasciculata choanomastigotes as a comparative approach to axenic growth, peanut lectin agglutination and differentiation of Leishmania spp. promastigotes.** PLoS One. 2014;9(12):e113837.
- Alcolea PJ, Alonso A, Sanchez-Gorostiaga A, Moreno-Paz M, Gomez MJ, Ramos I., y col. **Genome-wide analysis reveals increased levels of transcripts related with infectivity in peanut lectin non-agglutinated promastigotes of Leishmania infantum.** Genomics. 2009 Jun;93(6):551-564.
- Alexander B, Maroli M. **Control of phlebotomine sandflies.** Med Vet Entomol. 2003 Mar;17(1):1-18.
- Alexander J, Russell DG. **The interaction of Leishmania species with macrophages.** Adv Parasitol. 1992;31:175-254.
- Alvar J, Aparicio P, Aseffa A, Den Boer M, Canavate C, Dedet JP., y col. **The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years.** Clin Microbiol Rev. 2008 Apr;21(2):334-359, table of contents.
- Alves JM, Voegtly L, Matveyev AV, Lara AM, da Silva FM, Serrano MG., y col. **Identification and phylogenetic analysis of heme synthesis genes in trypanosomatids and their bacterial endosymbionts.** PLoS One. 2011;6(8):e23518.
- Alzate JF, Alvarez-Barrientos A, Gonzalez VM, Jimenez-Ruiz A. **Heat-induced programmed cell death in Leishmania infantum is reverted by Bcl-X(L) expression.** Apoptosis. 2006 Feb;11(2):161-171.
- Antoine JC, Prina E, Lang T, Courret N. **The biogenesis and properties of the parasitophorous vacuoles that harbour Leishmania in murine macrophages.** Trends Microbiol. 1998 Oct;6(10):392-401.
- Antunes CM, Mayrink W, Magalhaes PA, Costa CA, Melo MN, Dias M., y col. **Controlled field trials of a vaccine against New World cutaneous leishmaniasis.** Int J Epidemiol. 1986 Dec;15(4):572-580.
- Bacchi CJ, Goldberg B, Rattendi D, Gorrell TE, Spiess AJ, Sufrin JR. **Metabolic effects of a methylthioadenosine phosphorylase substrate analog on African trypanosomes.** Biochem Pharmacol. 1999 Jan 1;57(1):89-96.
- Bacellar O, D'Oliveira A, Jr., Jeronimo S, Carvalho EM. **IL-10 and IL-12 are the main regulatory cytokines in visceral leishmaniasis.** Cytokine. 2000 Aug;12(8):1228-1231.

Badaro R, Eulalio MC, Benson D, Freire M, Miranda JC, Pedral-Sampaio D., y col. **Sensitivity and specificity of a recombinant *Leishmania chagasi* antigen in the serodiagnosis of visceral leishmaniasis.** Arch Inst Pasteur Tunis. 1993 Jul-Oct;70(3-4):331-332.

Banerjee SK, Kessler PS, Saveria T, Parsons M. **Identification of trypanosomatid PEX19: functional characterization reveals impact on cell growth and glycosome size and number.** Mol Biochem Parasitol. 2005 Jul;142(1):47-55.

Barak E, Amin-Spector S, Gerliak E, Goyard S, Holland N, Zilberstein D. **Differentiation of *Leishmania donovani* in host-free system: analysis of signal perception and response.** Mol Biochem Parasitol. 2005 May;141(1):99-108.

Barbieri CL. **Immunology of canine leishmaniasis.** Parasite Immunol. 2006 Jul;28(7):329-337.

Barros VC, Oliveira JS, Melo MN, Gontijo NF. ***Leishmania amazonensis*: chemotactic and osmotactic responses in promastigotes and their probable role in development in the phlebotomine gut.** Exp Parasitol. 2006 Mar;112(3):152-157.

Bates PA. **Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies.** Int J Parasitol. 2007 Aug;37(10):1097-1106.

Bech-Otschir D, Helfrich A, Enenkel C, Consiglieri G, Seeger M, Holzhutter HG., y col. **Polyubiquitin substrates allosterically activate their own degradation by the 26S proteasome.** Nat Struct Mol Biol. 2009 Feb;16(2):219-225.

Ben Salah A, Ben Messaoud N, Guedri E, Zaatour A, Ben Alaya N, Bettaieb J., y col. **Topical paromomycin with or without gentamicin for cutaneous leishmaniasis.** N Engl J Med. 2013 Feb 7;368(6):524-532.

Berens RL, Marr JJ. **An easily prepared defined medium for cultivation of *Leishmania donovani* promastigotes.** J Parasitol. 1978 Feb;64(1):160.

Berger BJ, Dai WW, Wang H, Stark RE, Cerami A. **Aromatic amino acid transamination and methionine recycling in trypanosomatids.** Proc Natl Acad Sci U S A. 1996 Apr 30;93(9):4126-4130.

Berger LC, Wilson J, Wood P, Berger BJ. **Methionine regeneration and aspartate aminotransferase in parasitic protozoa.** J Bacteriol. 2001 Aug;183(15):4421-4434.

Berman JD. **Activity of imidazoles against *Leishmania tropica* in human macrophage cultures.** Am J Trop Med Hyg. 1981 May;30(3):566-569.

Bethony JM, Cole RN, Guo X, Kamhawi S, Lightowers MW, Loukas A., y col. **Vaccines to combat the neglected tropical diseases.** Immunol Rev. 2011 Jan;239(1):237-270.

Blankenfeldt W, Nowicki C, Montemartini-Kalisz M, Kalisz HM, Hecht HJ. **Crystal structure of *Trypanosoma cruzi* tyrosine aminotransferase: substrate specificity is influenced by cofactor binding mode.** Protein Sci. 1999 Nov;8(11):2406-2417.

Bradford MM. **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** Anal Biochem. 1976 May 7;72:248-254.

- Bray PG, Barrett MP, Ward SA, de Koning HP. **Pentamidine uptake and resistance in pathogenic protozoa: past, present and future.** Trends Parasitol. 2003 May;19(5):232-239.
- Brennicke A, Marchfelder A, Binder S. **RNA editing.** FEMS Microbiol Rev. 1999 Jun;23(3):297-316.
- Brindisi M, Brogi S, Relitti N, Vallone A, Butini S, Gemma S., y col. **Structure-based discovery of the first non-covalent inhibitors of Leishmania major tryparedoxin peroxidase by high throughput docking.** Sci Rep. 2015;5:9705.
- Bringaud F, Barrett MP, Zilberstein D. **Multiple roles of proline transport and metabolism in trypanosomatids.** Front Biosci (Landmark Ed). 2012;17:349-374.
- Brittingham A, Chen G, McGwire BS, Chang KP, Mosser DM. **Interaction of Leishmania gp63 with cellular receptors for fibronectin.** Infect Immun. 1999 Sep;67(9):4477-4484.
- Byers TL, Bush TL, McCann PP, Bitonti AJ. **Antitrypanosomal effects of polyamine biosynthesis inhibitors correlate with increases in Trypanosoma brucei brucei S-adenosyl-L-methionine.** Biochem J. 1991 Mar 1;274 (Pt 2):527-533.
- Carcelen J, Iniesta V, Fernandez-Cotrino J, Serrano F, Parejo JC, Corraliza I., y col. **The chimerical multi-component Q protein from Leishmania in the absence of adjuvant protects dogs against an experimental Leishmania infantum infection.** Vaccine. 2009 Oct 9;27(43):5964-5973.
- Carter NS, Yates PA, Gessford SK, Galagan SR, Landfear SM, Ullman B. **Adaptive responses to purine starvation in Leishmania donovani.** Mol Microbiol. 2010 Oct;78(1):92-107.
- Castanys S, Osuna A, Gamarro F, Ruiz-Perez LM. **Purification of metacyclic forms of Trypanosoma cruzi by Percoll discontinuous gradient centrifugation.** Z Parasitenkd. 1984;70(4):443-449.
- Cavalier-Smith T. **Eukaryote kingdoms: seven or nine?** Biosystems. 1981;14(3-4):461-481.
- Cavalier-Smith T. **Kingdom protozoa and its 18 phyla.** Microbiol Rev. 1993 Dec;57(4):953-994.
- Ciechanover A, Hargrove JL, Gross-Mesilaty S. **Ubiquitin-mediated degradation of tyrosine aminotransferase (TAT) in vitro and in vivo.** Mol Biol Rep. 1997 Mar;24(1-2):27-33.
- Coelho AC, Messier N, Ouellette M, Cotrim PC. **Role of the ABC transporter PRP1 (ABCC7) in pentamidine resistance in Leishmania amastigotes.** Antimicrob Agents Chemother. 2007 Aug;51(8):3030-3032.
- Cojean S, Houze S, Haouchine D, Huteau F, Lariven S, Hubert V., y col. **Leishmania resistance to miltefosine associated with genetic marker.** Emerg Infect Dis. 2012 Apr;18(4):704-706.
- Colotti G, Ilari A. **Polyamine metabolism in Leishmania: from arginine to trypanothione.** Amino Acids. 2011 Feb;40(2):269-285.
- Colovos C, Yeates TO. **Verification of protein structures: patterns of nonbonded atomic interactions.** Protein Sci. 1993 Sep;2(9):1511-1519.
- Constantas NS, Levis GM, Vakirtzi-Lemonias CS. **Crithidia fasciculata tyrosine transaminase. I. Development, characterization and differentiation from alanine transaminase.** Biochim Biophys Acta. 1971 Jan 26;230(1):137-145.

Convit J, Pinardi ME, Rondon AJ. **Diffuse cutaneous leishmaniasis: a disease due to an immunological defect of the host.** Trans R Soc Trop Med Hyg. 1972;66(4):603-610.

Cowtan K. **The Buccaneer software for automated model building. 1. Tracing protein chains.** Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 2006 Sep;62(Pt 9):1002-1011.

Cowtan K. **Recent developments in classical density modification.** Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 2010 Apr;66(Pt 4):470-478.

Cull B, Prado Godinho JL, Fernandes Rodrigues JC, Frank B, Schurigt U, Williams RA., y col. **Glycosome turnover in Leishmania major is mediated by autophagy.** Autophagy. 2014;10(12):2143-2157.

Chang KP, Fong Y, Bray RS. **Biology of Leishmania and leishmaniasis.** Elsevier Science, Amsterdam, pp 1-30. 1985.

Chatterjee AN, Ghosh JJ. **Transaminases of Leishmania donovani, the causative organism of kala-azar.** Nature. 1957 Dec 21;180(4599):1425.

Chen JH, Linstead E, Swamidass SJ, Wang D, Baldi P. **ChemDB update--full-text search and virtual chemical space.** Bioinformatics. 2007 Sep 1;23(17):2348-2351.

Chen VB, Arendall WB, 3rd, Headd JJ, Keedy DA, Immormino RM, Kapral GJ., y col. **MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography.** Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 2010 Jan;66(Pt 1):12-21.

Chernukhin IV, Klenova EM. **A method of immobilization on the solid support of complex and simple enzymes retaining their activity.** Anal Biochem. 2000 Apr 10;280(1):178-181.

Christen P, Mehta PK. **From cofactor to enzymes. The molecular evolution of pyridoxal-5'-phosphate-dependent enzymes.** Chem Rec. 2001;1(6):436-447.

Chulay JD, Fleckenstein L, Smith DH. **Pharmacokinetics of antimony during treatment of visceral leishmaniasis with sodium stibogluconate or meglumine antimoniate.** Trans R Soc Trop Med Hyg. 1988;82(1):69-72.

da Silva ER, Boechat N, Pinheiro LC, Bastos MM, Costa CC, Bartholomeu JC., y col. **Novel Selective Inhibitor of Leishmania (Leishmania) amazonensis Arginase.** Chem Biol Drug Des. 2015 Nov;86(5):969-978.

Dantas-Torres F. **Leishmune vaccine: the newest tool for prevention and control of canine visceral leishmaniasis and its potential as a transmission-blocking vaccine.** Vet Parasitol. 2006 Oct 10;141(1-2):1-8.

David CV, Craft N. **Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis.** Dermatol Ther. 2009 Nov-Dec;22(6):491-502.

de Souza W, Rodrigues JC. **Sterol Biosynthesis Pathway as Target for Anti-trypanosomatid Drugs.** Interdiscip Perspect Infect Dis. 2009;2009:642502.

- Debrabant A, Joshi MB, Pimenta PF, Dwyer DM. **Generation of *Leishmania donovani* axenic amastigotes: their growth and biological characteristics.** Int J Parasitol. 2004 Feb;34(2):205-217.
- Desjeux P. **The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide.** Trans R Soc Trop Med Hyg. 2001 May-Jun;95(3):239-243.
- Dey S, Baird TD, Zhou D, Palam LR, Spandau DF, Wek RC. **Both transcriptional regulation and translational control of ATF4 are central to the integrated stress response.** J Biol Chem. 2010 Oct 22;285(43):33165-33174.
- Diamondstone TI. **Assay of tyrosine transaminase activity by conversion of p-hydroxyphenylpyruvate to p-hydroxybenzaldehyde.** Analytical Biochemistry. 1966;16(3):395-401.
- Dupe A, Dumas C, Papadopoulou B. **Differential Subcellular Localization of *Leishmania* Alpha-Domain Proteins throughout the Parasite Development.** PLoS One. 2015;10(9):e0137243.
- El-Sayed NM, Myler PJ, Bartholomeu DC, Nilsson D, Aggarwal G, Tran AN., y col. **The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease.** Science. 2005 Jul 15;309(5733):409-415.
- Emsley P, Lohkamp B, Scott WG, Cowtan K. **Features and development of Coot.** Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 2010 Apr;66(Pt 4):486-501.
- Ferguson MA. **The surface glycoconjugates of trypanosomatid parasites.** Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 1997 Sep 29;352(1359):1295-1302.
- Fernandez MM, Malchiodi EL, Algranati ID. **Differential effects of paromomycin on ribosomes of *Leishmania mexicana* and mammalian cells.** Antimicrob Agents Chemother. 2011 Jan;55(1):86-93.
- Ferrer L. **[Canine leishmaniasis in Spain: data for the clinician].** Enferm Infecc Microbiol Clin. 1989 Jun-Jul;7(6):293-295.
- Flannery AR, Huynh C, Mittra B, Mortara RA, Andrews NW. **LFR1 ferric iron reductase of *Leishmania amazonensis* is essential for the generation of infective parasite forms.** J Biol Chem. 2011 Jul 1;286(26):23266-23279.
- Fraga J, Montalvo AM, De Doncker S, Dujardin JC, Van der Auwera G. **Phylogeny of *Leishmania* species based on the heat-shock protein 70 gene.** Infect Genet Evol. 2010 Mar;10(2):238-245.
- Francino O, Altet L, Sanchez-Robert E, Rodriguez A, Solano-Gallego L, Alberola J., y col. **Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis.** Vet Parasitol. 2006 Apr 30;137(3-4):214-221.
- Fulenwider JT, Nordlinger BM, Faraj BA, Ivey GL, Rudman D. **Deranged tyrosine metabolism in cirrhosis.** Yale J Biol Med. 1978 Nov-Dec;51(6):625-633.
- Garcia-Estrada C, Perez-Pertejo Y, Ordonez D, Balana-Fouce R, Reguera RM. **Analysis of genetic elements regulating the methionine adenosyltransferase gene in *Leishmania infantum*.** Gene. 2007 Mar 15;389(2):163-173.

Ghalib HW, Piuvezam MR, Skeiky YA, Siddig M, Hashim FA, el-Hassan AM., y col. **Interleukin 10 production correlates with pathology in human *Leishmania donovani* infections.** J Clin Invest. 1993 Jul;92(1):324-329.

Ginger ML, Chance ML, Sadler IH, Goad LJ. **The biosynthetic incorporation of the intact leucine skeleton into sterol by the trypanosomatid *Leishmania mexicana*.** J Biol Chem. 2001 Apr 13;276(15):11674-11682.

Ginger ML, Prescott MC, Reynolds DG, Chance ML, Goad LJ. **Utilization of leucine and acetate as carbon sources for sterol and fatty acid biosynthesis by Old and New World *Leishmania* species, *Endotrypanum monterogeii* and *Trypanosoma cruzi*.** Eur J Biochem. 2000 May;267(9):2555-2566.

Giudice A, Canada I, Leopoldo PT, Pereira JM, Riley LW, Wilson ME., y col. **Resistance of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and *Leishmania (Viannia) braziliensis* to nitric oxide correlates with disease severity in Tegumentary Leishmaniasis.** BMC Infect Dis. 2007;7:7.

Goldberg B, Rattendi D, Lloyd D, Sufrin JR, Bacchi CJ. **Effects of intermediates of methionine metabolism and nucleoside analogs on S-adenosylmethionine transport by *Trypanosoma brucei brucei* and a drug-resistant *Trypanosoma brucei rhodesiense*.** Biochem Pharmacol. 1998 Jul 1;56(1):95-103.

Gomes DC, Pinto EF, de Melo LD, Lima WP, Larraga V, Lopes UG., y col. **Intranasal delivery of naked DNA encoding the LACK antigen leads to protective immunity against visceral leishmaniasis in mice.** Vaccine. 2007 Mar 8;25(12):2168-2172.

Gonzalez-Aseguinolaza G, Almazan F, Rodriguez JF, Marquet A, Larraga V. **Cloning of the gp63 surface protease of *Leishmania infantum*. Differential post-translational modifications correlated with different infective forms.** Biochim Biophys Acta. 1997 Jul 10;1361(1):92-102.

Gonzalo RM, del Real G, Rodriguez JR, Rodriguez D, Heljasvaara R, Lucas P., y col. **A heterologous prime-boost regime using DNA and recombinant vaccinia virus expressing the *Leishmania infantum* P36/LACK antigen protects BALB/c mice from cutaneous leishmaniasis.** Vaccine. 2002 Jan 15;20(7-8):1226-1231.

Gonzalo RM, Rodriguez JR, Rodriguez D, Gonzalez-Aseguinolaza G, Larraga V, Esteban M. **Protective immune response against cutaneous leishmaniasis by prime/booster immunization regimens with vaccinia virus recombinants expressing *Leishmania infantum* p36/LACK and IL-12 in combination with purified p36.** Microbes Infect. 2001 Jul;3(9):701-711.

Grishin NV, Phillips MA, Goldsmith EJ. **Modeling of the spatial structure of eukaryotic ornithine decarboxylases.** Protein Sci. 1995 Jul;4(7):1291-1304.

Gross-Mesilaty S, Hargrove JL, Ciechanover A. **Degradation of tyrosine aminotransferase (TAT) via the ubiquitin-proteasome pathway.** FEBS Lett. 1997 Mar 24;405(2):175-180.

Gumy A, Louis JA, Launois P. **The murine model of infection with *Leishmania major* and its importance for the deciphering of mechanisms underlying differences in Th cell differentiation in mice from different genetic backgrounds.** Int J Parasitol. 2004 Mar 29;34(4):433-444.

Gupta AK, Saran R. **In-vitro maintenance of *Leishmania donovani* promastigotes in a cheap, serum-free, hemin-based, autoclavable culture medium.** J Commun Dis. 1991 Dec;23(4):276-277.

Gupta S. **Visceral leishmaniasis: experimental models for drug discovery.** Indian J Med Res. 2011 Jan;133:27-39.

Haanstra JR, van Tuijl A, Kessler P, Reijnders W, Michels PA, Westerhoff HV., y col. **Compartmentation prevents a lethal turbo-explosion of glycolysis in trypanosomes.** Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 Nov 18;105(46):17718-17723.

Hall JE, Seed JR, Sechelski JB. **Multiple alpha-keto aciduria in *Microtus montanus* chronically infected with *Trypanosoma brucei gambiense*.** Comp Biochem Physiol B. 1985;82(1):73-78.

Hanahan D. **Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids.** J Mol Biol. 1983 Jun 5;166(4):557-580.

Handman E. **Leishmaniasis: current status of vaccine development.** Clin Microbiol Rev. 2001 Apr;14(2):229-243.

Hargrove JL, Wichman RD. **A cystine-dependent inactivator of tyrosine aminotransferase co-purifies with gamma-cystathionase (cystine desulfurase).** J Biol Chem. 1987 May 25;262(15):7351-7357.

Hausmann K, Hülsmann N. **Protozoology 2^o ed.** Georg Thieme Verlag Stuttgart. 1996.

Hayashi H, Mizuguchi H, Kagamiyama H. **The imine-pyridine torsion of the pyridoxal 5'-phosphate Schiff base of aspartate aminotransferase lowers its pKa in the unliganded enzyme and is crucial for the successive increase in the pKa during catalysis.** Biochemistry. 1998 Oct 27;37(43):15076-15085.

Hendricks LD, Wood DE, Hajduk ME. **Haemoflagellates: commercially available liquid media for rapid cultivation.** Parasitology. 1978 Jun;76(3):309-316.

Herwaldt BL. **Leishmaniasis.** Lancet. 1999 Oct 2;354(9185):1191-1199.

Hide M, Banuls AL, Tibayrenc M. **Genetic heterogeneity and phylogenetic status of *Leishmania (Leishmania) infantum* zymodeme MON-1: epidemiological implications.** Parasitology. 2001 Nov;123(Pt 5):425-432.

Hide M, Ritleng AS, Brizard JP, Monte-Allegre A, Sereno D. ***Leishmania infantum*: tuning digitonin fractionation for comparative proteomic of the mitochondrial protein content.** Parasitol Res. 2008 Sep;103(4):989-992.

Hommel M. **The genus *Leishmania*: Biology of the parasites and clinical aspects.** Bulletin de L'Institut Pasteur, Paris. 1978;75:5-102.

Honigberg BM, Balamuth W, Bovee EC, Corliss JO, Gojdics M, Hall RP., y col. **A Revised Classification of the Phylum Protozoa.** J Protozool. 1964 Feb;11:7-20.

Hoyer C, Zander D, Fleischer S, Schilhabel M, Kroener M, Platzner M., y col. **A *Leishmania donovani* gene that confers accelerated recovery from stationary phase growth arrest.** Int J Parasitol. 2004 Jun;34(7):803-811.

Hsieh JY, Liu GY, Chang GG, Hung HC. **Determinants of the dual cofactor specificity and substrate cooperativity of the human mitochondrial NAD(P)⁺-dependent malic enzyme: functional roles of glutamine 362.** J Biol Chem. 2006 Aug 11;281(32):23237-23245.

Iovannisci DM, Ullman B. **High efficiency plating method for Leishmania promastigotes in semidefined or completely-defined medium.** J Parasitol. 1983 Aug;69(4):633-636.

Iwasaki M, Hayashi H, Kagamiyama H. **Protonation state of the active-site Schiff base of aromatic amino acid aminotransferase: modulation by binding of ligands and implications for its role in catalysis.** J Biochem. 1994 Jan;115(1):156-161.

Jager J, Moser M, Sauder U, Jansonius JN. **Crystal structures of Escherichia coli aspartate aminotransferase in two conformations. Comparison of an unliganded open and two liganded closed forms.** J Mol Biol. 1994 Jun 3;239(2):285-305.

Jensen RA, Gu W. **Evolutionary recruitment of biochemically specialized subdivisions of Family I within the protein superfamily of aminotransferases.** J Bacteriol. 1996 Apr;178(8):2161-2171.

Jimenez M, Gonzalez E, Iriso A, Marco E, Alegret A, Fuster F., y col. **Detection of Leishmania infantum and identification of blood meals in Phlebotomus perniciosus from a focus of human leishmaniasis in Madrid, Spain.** Parasitol Res. 2013 Jul;112(7):2453-2459.

Kabsch W. **Xds.** Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 2010 Feb;66(Pt 2):125-132.

Kamitori S, Okamoto A, Hirotsu K, Higuchi T, Kuramitsu S, Kagamiyama H., y col. **Three-dimensional structures of aspartate aminotransferase from Escherichia coli and its mutant enzyme at 2.5 Å resolution.** J Biochem. 1990 Aug;108(2):175-184.

Kar K, Mukerji K, Naskar K, Bhattacharya A, Ghosh DK. **Leishmania donovani: a chemically defined medium suitable for cultivation and cloning of promastigotes and transformation of amastigotes to promastigotes.** J Protozool. 1990 Jul-Aug;37(4):277-279.

Kasper P, Sterk M, Christen P, Gehring H. **Molecular-dynamics simulation of domain movements in aspartate aminotransferase.** Eur J Biochem. 1996 Sep 15;240(3):751-755.

Kelleher M, Bacic A, Handman E. **Identification of a macrophage-binding determinant on lipophosphoglycan from Leishmania major promastigotes.** Proc Natl Acad Sci U S A. 1992 Jan 1;89(1):6-10.

Kirsch JF, Eichele G, Ford GC, Vincent MG, Jansonius JN, Gehring H., y col. **Mechanism of action of aspartate aminotransferase proposed on the basis of its spatial structure.** J Mol Biol. 1984 Apr 15;174(3):497-525.

Kleiger G, Grothe R, Mallick P, Eisenberg D. **GXXXG and AXXXA: common alpha-helical interaction motifs in proteins, particularly in extremophiles.** Biochemistry. 2002 May 14;41(19):5990-5997.

Koreny L, Lukes J, Obornik M. **Evolution of the haem synthetic pathway in kinetoplastid flagellates: an essential pathway that is not essential after all?** Int J Parasitol. 2010 Feb;40(2):149-156.

Kuramitsu S, Inoue K, Kondo K, Aki K, Kagamiyama H. **Aspartate aminotransferase isozymes from rabbit liver. Purification and properties.** J Biochem. 1985 May;97(5):1337-1345.

Laemmli UK. **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.** Nature. 1970 Aug 15;227(5259):680-685.

Leelayoova S, Marbury D, Rainey PM, Mackenzie NE, Hall JE. **In vitro tryptophan catabolism by Leishmania donovani donovani promastigotes.** J Protozool. 1992 Mar-Apr;39(2):350-358.

Legare D, Richard D, Mukhopadhyay R, Stierhof YD, Rosen BP, Haimeur A., y col. **The Leishmania ATP-binding cassette protein PGPA is an intracellular metal-thiol transporter ATPase.** J Biol Chem. 2001 Jul 13;276(28):26301-26307.

Lemma A, Schiller EL. **Extracellular Cultivation of the Leishmanial Bodies of Species Belonging to the Protozoan Genus Leishmania.** Exp Parasitol. 1964 Dec;15:503-513.

Leroux A, Fleming-Canepa X, Aranda A, Maugeri D, Cazzulo JJ, Sanchez MA., y col. **Functional characterization and subcellular localization of the three malate dehydrogenase isozymes in Leishmania spp.** Mol Biochem Parasitol. 2006 Sep;149(1):74-85.

Lira R, Sundar S, Makharia A, Kenney R, Gam A, Saraiva E., y col. **Evidence that the high incidence of treatment failures in Indian kala-azar is due to the emergence of antimony-resistant strains of Leishmania donovani.** J Infect Dis. 1999 Aug;180(2):564-567.

Listovsky T, Brandeis M, Zilberstein D. **Leishmania express a functional Cdc20 homologue.** Biochem Biophys Res Commun. 2011 Apr 29;408(1):71-77.

Loeber G, Maurer-Fogy I, Schwendenwein R. **Purification, cDNA cloning and heterologous expression of the human mitochondrial NADP(+)-dependent malic enzyme.** Biochem J. 1994 Dec 15;304 (Pt 3):687-692.

Loiseau PM, Cojean S, Schrevel J. **Sitamaquine as a putative antileishmanial drug candidate: from the mechanism of action to the risk of drug resistance.** Parasite. 2011 May;18(2):115-119.

Lovell SC, Davis IW, Arendall WB, 3rd, de Bakker PI, Word JM, Prisant MG., y col. **Structure validation by Calpha geometry: phi,psi and Cbeta deviation.** Proteins. 2003 Feb 15;50(3):437-450.

Lukes J, Mauricio IL, Schonian G, Dujardin JC, Soteriadou K, Dedet JP., y col. **Evolutionary and geographical history of the Leishmania donovani complex with a revision of current taxonomy.** Proc Natl Acad Sci U S A. 2007 May 29;104(22):9375-9380.

Lux H, Heise N, Klenner T, Hart D, Oppendoes FR. **Ether--lipid (alkyl-phospholipid) metabolism and the mechanism of action of ether--lipid analogues in Leishmania.** Mol Biochem Parasitol. 2000 Nov;111(1):1-14.

Mancianti F, Meciani N. **Specific serodiagnosis of canine leishmaniasis by indirect immunofluorescence, indirect hemagglutination, and counterimmunoelectrophoresis.** Am J Vet Res. 1988 Aug;49(8):1409-1411.

Mandal G, Mandal S, Sharma M, Charret KS, Papadopoulou B, Bhattacharjee H., y col. **Species-specific antimonial sensitivity in Leishmania is driven by post-transcriptional regulation of AQP1.** PLoS Negl Trop Dis. 2015 Feb;9(2):e0003500.

- Marciano D, Maugeri DA, Cazzulo JJ, Nowicki C. **Functional characterization of stage-specific aminotransferases from trypanosomatids.** Mol Biochem Parasitol. 2009 Aug;166(2):172-182.
- Martin JL, Yates PA, Soysa R, Alfaro JF, Yang F, Burnum-Johnson KE., y col. **Metabolic reprogramming during purine stress in the protozoan pathogen Leishmania donovani.** PLoS Pathog. 2014 Feb;10(2):e1003938.
- Martinez S, Looker DL, Berens RL, Marr JJ. **The synergistic action of pyrazolopyrimidines and pentavalent antimony against Leishmania donovani and L. braziliensis.** Am J Trop Med Hyg. 1988 Sep;39(3):250-255.
- Mary C, Auriault V, Faugere B, Dessein AJ. **Control of Leishmania infantum infection is associated with CD8(+) and gamma interferon- and interleukin-5-producing CD4(+) antigen-specific T cells.** Infect Immun. 1999 Nov;67(11):5559-5566.
- Maugeri DA, Cazzulo JJ, Burchmore RJ, Barrett MP, Ogbunode PO. **Pentose phosphate metabolism in Leishmania mexicana.** Mol Biochem Parasitol. 2003 Aug 31;130(2):117-125.
- Mazet M, Harijan RK, Kiema TR, Haapalainen AM, Morand P, Morales J., y col. **The characterization and evolutionary relationships of a trypanosomal thiolase.** Int J Parasitol. 2011 Oct;41(12):1273-1283.
- McConville MJ, Blackwell JM. **Developmental changes in the glycosylated phosphatidylinositols of Leishmania donovani. Characterization of the promastigote and amastigote glycolipids.** J Biol Chem. 1991 Aug 15;266(23):15170-15179.
- McConville MJ, de Souza D, Saunders E, Likic VA, Naderer T. **Living in a phagolysosome; metabolism of Leishmania amastigotes.** Trends Parasitol. 2007 Aug;23(8):368-375.
- McConville MJ, Ralton JE. **Developmentally regulated changes in the cell surface architecture of Leishmania parasites.** Behring Inst Mitt. 1997 Mar(99):34-43.
- McConville MJ, Turco SJ, Ferguson MA, Sacks DL. **Developmental modification of lipophosphoglycan during the differentiation of Leishmania major promastigotes to an infectious stage.** EMBO J. 1992 Oct;11(10):3593-3600.
- McCoy AJ, Grosse-Kunstleve RW, Adams PD, Winn MD, Storoni LC, Read RJ. **Phaser crystallographic software.** J Appl Crystallogr. 2007 Aug 1;40(Pt 4):658-674.
- Mehere P, Han Q, Lemkul JA, Vavricka CJ, Robinson H, Bevan DR., y col. **Tyrosine aminotransferase: biochemical and structural properties and molecular dynamics simulations.** Protein Cell. 2010 Nov;1(11):1023-1032.
- Mehta PK, Christen P. **The molecular evolution of pyridoxal-5'-phosphate-dependent enzymes.** Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol. 2000;74:129-184.
- Melo NM, de Azevedo HP, Roitman I, Mayrink W. **A new defined medium for cultivating Leishmania promastigotes.** Acta Trop. 1985 Jun;42(2):137-141.
- Mengeling BJ, Beverley SM, Turco SJ. **Designing glycoconjugate biosynthesis for an insidious intent: phosphoglycan assembly in Leishmania parasites.** Glycobiology. 1997 Oct;7(7):873-880.

Merlen T, Sereno D, Brajon N, Rostand F, Lemesre JL. **Leishmania spp: completely defined medium without serum and macromolecules (CDM/LP) for the continuous in vitro cultivation of infective promastigote forms.** Am J Trop Med Hyg. 1999 Jan;60(1):41-50.

Miguel DC, Flannery AR, Mittra B, Andrews NW. **Heme uptake mediated by LHR1 is essential for Leishmania amazonensis virulence.** Infect Immun. 2013 Oct;81(10):3620-3626.

Miro G, Montoya A, Mateo M, Alonso A, Garcia S, Garcia A., y col. **A leishmaniosis surveillance system among stray dogs in the region of Madrid: ten years of serodiagnosis (1996-2006).** Parasitol Res. 2007 Jul;101(2):253-257.

Mishra M, Singh MP, Choudhury D, Singh VP, Khan AB. **Amphotericin B for second-line treatment of Indian kala-azar.** Lancet. 1991 Apr 13;337(8746):926.

Mittra B, Cortez M, Haydock A, Ramasamy G, Myler PJ, Andrews NW. **Iron uptake controls the generation of Leishmania infective forms through regulation of ROS levels.** J Exp Med. 2013 Feb 11;210(2):401-416.

Molina R, Canavate C, Cercenado E, Laguna F, Lopez-Velez R, Alvar J. **Indirect xenodiagnosis of visceral leishmaniasis in 10 HIV-infected patients using colonized Phlebotomus perniciosus.** AIDS. 1994 Feb;8(2):277-279.

Molina R, Jimenez MI, Cruz I, Iriso A, Martin-Martin I, Sevillano O., y col. **The hare (Lepus granatensis) as potential sylvatic reservoir of Leishmania infantum in Spain.** Vet Parasitol. 2012 Nov 23;190(1-2):268-271.

Montemartini M, Bua J, Bontempi E, Zelada C, Ruiz AM, Santome JA., y col. **A recombinant tyrosine aminotransferase from Trypanosoma cruzi has both tyrosine aminotransferase and alanine aminotransferase activities.** FEMS Microbiol Lett. 1995 Nov 1;133(1-2):17-20.

Montemartini M, Santome JA, Cazzulo JJ, Nowicki C. **Purification and partial structural and kinetic characterization of tyrosine aminotransferase from epimastigotes of Trypanosoma cruzi.** Biochem J. 1993 Jun 15;292 (Pt 3):901-906.

Montemartini M, Santome JA, Cazzulo JJ, Nowicki C. **Production of aromatic alpha-hydroxyacids by epimastigotes of Trypanosoma cruzi, and its possible role in NADH reoxidation.** FEMS Microbiol Lett. 1994a May 1;118(1-2):89-92.

Montemartini M, Santome JA, Cazzulo JJ, Nowicki C. **Purification and partial structural and kinetic characterization of an aromatic L-alpha-hydroxy acid dehydrogenase from epimastigotes of Trypanosoma cruzi.** Mol Biochem Parasitol. 1994b Nov;68(1):15-23.

Morales MA, Watanabe R, Laurent C, Lenormand P, Rousselle JC, Namane A., y col. **Phosphoproteomic analysis of Leishmania donovani pro- and amastigote stages.** Proteomics. 2008 Jan;8(2):350-363.

Moreno B, Urbina JA, Oldfield E, Bailey BN, Rodrigues CO, Docampo R. **³¹P NMR spectroscopy of Trypanosoma brucei, Trypanosoma cruzi, and Leishmania major. Evidence for high levels of condensed inorganic phosphates.** J Biol Chem. 2000 Sep 15;275(37):28356-28362.

Moreno J, Alvar J. **Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model.** Trends Parasitol. 2002 Sep;18(9):399-405.

Moreno J, Vouldoukis I, Martin V, McGahie D, Cuisinier AM, Gueguen S. **Use of a LiESP/QA-21 vaccine (CaniLeish) stimulates an appropriate Th1-dominated cell-mediated immune response in dogs.** PLoS Negl Trop Dis. 2012;6(6):e1683.

Mullin KA, Foth BJ, Ilgoutz SC, Callaghan JM, Zawadzki JL, McFadden GI, y col. **Regulated degradation of an endoplasmic reticulum membrane protein in a tubular lysosome in Leishmania mexicana.** Mol Biol Cell. 2001 Aug;12(8):2364-2377.

Naderer T, Ellis MA, Sernee MF, De Souza DP, Curtis J, Handman E., y col. **Virulence of Leishmania major in macrophages and mice requires the gluconeogenic enzyme fructose-1,6-bisphosphatase.** Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 Apr 4;103(14):5502-5507.

Nadim A, Javadian E, Tahvildar-Bidruni G, Ghorbani M. **Effectiveness of leishmanization in the control of cutaneous leishmaniasis.** Bull Soc Pathol Exot Filiales. 1983 Aug-Oct;76(4):377-383.

Neal RA, Miles RA. **Heated blood agar medium for the growth of Trypanosoma cruzi and some species of Leishmania.** Nature. 1963 Apr 13;198:210-211.

Nelson DJ, LaFon SW, Tuttle JV, Miller WH, Miller RL, Krenitsky TA., y col. **Allopurinol ribonucleoside as an antileishmanial agent. Biological effects, metabolism, and enzymatic phosphorylation.** J Biol Chem. 1979 Nov 25;254(22):11544-11549.

Newport GR, Page CR, 3rd, Ashman PU, Stibbs HH, Seed JR. **Alteration of free serum amino acids in voles infected with Trypanosoma brucei gambiense.** J Parasitol. 1977 Feb;63(1):15-24.

Nielsen M, Lundegaard C, Lund O, Petersen TN. **CPHmodels-3.0--remote homology modeling using structure-guided sequence profiles.** Nucleic Acids Res. 2010 Jul;38(Web Server issue):W576-581.

Nowicki C, Cazzulo JJ. **Aromatic amino acid catabolism in trypanosomatids.** Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol. 2008 Nov;151(3):381-390.

Nowicki C, Hunter GR, Montemartini-Kalisz M, Blankenfeldt W, Hecht H, Kalisz HM. **Recombinant tyrosine aminotransferase from Trypanosoma cruzi: structural characterization and site directed mutagenesis of a broad substrate specificity enzyme.** Biochim Biophys Acta. 2001 Apr 7;1546(2):268-281.

Nugent PG, Karsani SA, Wait R, Tempero J, Smith DF. **Proteomic analysis of Leishmania mexicana differentiation.** Mol Biochem Parasitol. 2004 Jul;136(1):51-62.

Oppeerdoes FR, Coombs GH. **Metabolism of Leishmania: proven and predicted.** Trends Parasitol. 2007 Apr;23(4):149-158.

Oppeerdoes FR, Szikora JP. **In silico prediction of the glycosomal enzymes of Leishmania major and trypanosomes.** Mol Biochem Parasitol. 2006 Jun;147(2):193-206.

Osman OF, Oskam L, Kroon NC, Schoone GJ, Khalil ET, El-Hassan AM., y col. **Use of PCR for diagnosis of post-kala-azar dermal leishmaniasis.** J Clin Microbiol. 1998 Jun;36(6):1621-1624.

Otranto D, Dantas-Torres F. **The prevention of canine leishmaniasis and its impact on public health.** Trends Parasitol. 2013 Jul;29(7):339-345.

Peacock CS, Seeger K, Harris D, Murphy L, Ruiz JC, Quail MA., y col. **Comparative genomic analysis of three Leishmania species that cause diverse human disease.** Nat Genet. 2007 Jul;39(7):839-847.

Perez-Pertejo Y, Alvarez-Velilla R, Estrada CG, Balana-Fouce R, Reguera RM. **Leishmania donovani: proteasome-mediated down-regulation of methionine adenosyltransferase.** Parasitology. 2011 Aug;138(9):1082-1092.

Pigott DM, Bhatt S, Golding N, Duda KA, Battle KE, Brady OJ., y col. **Global distribution maps of the leishmaniasis.** Elife. 2014;3.

Pimenta PF, Modi GB, Pereira ST, Shahabuddin M, Sacks DL. **A novel role for the peritrophic matrix in protecting Leishmania from the hydrolytic activities of the sand fly midgut.** Parasitology. 1997 Oct;115 (Pt 4):359-369.

Pinto EF, Pinheiro RO, Rayol A, Larraga V, Rossi-Bergmann B. **Intranasal vaccination against cutaneous leishmaniasis with a particulated leishmanial antigen or DNA encoding LACK.** Infect Immun. 2004 Aug;72(8):4521-4527.

Puentes SM, Dwyer DM, Bates PA, Joiner KA. **Binding and release of C3 from Leishmania donovani promastigotes during incubation in normal human serum.** J Immunol. 1989 Dec 1;143(11):3743-3749.

Purkait B, Kumar A, Nandi N, Sardar AH, Das S, Kumar S., y col. **Mechanism of amphotericin B resistance in clinical isolates of Leishmania donovani.** Antimicrob Agents Chemother. 2012 Feb;56(2):1031-1041.

Quash G, Roch AM, Charlot C, Chantepie J, Thomas V, Hamed-Sangsari F., y col. **4-methylthio 2-oxobutanoate transaminase: a specific target for antiproliferative agents.** Bull Cancer. 2004 Apr;91(4):E61-79.

Ramos H, Valdivieso E, Gamargo M, Dagger F, Cohen BE. **Amphotericin B kills unicellular leishmanias by forming aqueous pores permeable to small cations and anions.** J Membr Biol. 1996 Jul;152(1):65-75.

Ramos I, Alonso A, Marcen JM, Peris A, Castillo JA, Colmenares M., y col. **Heterologous prime-boost vaccination with a non-replicative vaccinia recombinant vector expressing LACK confers protection against canine visceral leishmaniasis with a predominant Th1-specific immune response.** Vaccine. 2008 Jan 17;26(3):333-344.

Ramos I, Alonso A, Peris A, Marcen JM, Abengozar MA, Alcolea PJ., y col. **Antibiotic resistance free plasmid DNA expressing LACK protein leads towards a protective Th1 response against Leishmania infantum infection.** Vaccine. 2009 Nov 12;27(48):6695-6703.

Rangel H, Dagger F, Hernandez A, Liendo A, Urbina JA. **Naturally azole-resistant Leishmania braziliensis promastigotes are rendered susceptible in the presence of terbinafine: comparative study with azole-susceptible Leishmania mexicana promastigotes.** Antimicrob Agents Chemother. 1996 Dec;40(12):2785-2791.

Rego JV, Murta SM, Nirde P, Nogueira FB, de Andrade HM, Romanha AJ. **Trypanosoma cruzi: characterisation of the gene encoding tyrosine aminotransferase in benzimidazole-resistant and susceptible populations.** Exp Parasitol. 2008 Jan;118(1):111-117.

Rios MC, Silva WR, Azevedo AF, Santos PL, Teixeira SA, Muscara MN., y col. **Expression of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase is enhanced in Leishmania spp naturally resistant to nitric oxide.** Genet Mol Res. 2015;14(2):7113-7121.

Rioux JA, Lanotte G. **Leishmania infantum as a cause of cutaneous leishmaniasis.** Trans R Soc Trop Med Hyg. 1990 Nov-Dec;84(6):898.

Rioux JA, Lanotte G, Serres E, Pratlong F, Bastien P, Perieres J. **Taxonomy of Leishmania. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification.** Ann Parasitol Hum Comp. 1990;65(3):111-125.

Rioux JA, Moreno G, Lanotte G, Pratlong F, Dereure J, Rispaill P. **Two episodes of cutaneous leishmaniasis in man caused by different zymodemes of Leishmania infantum s.l.** Trans R Soc Trop Med Hyg. 1986;80(6):1004-1005.

Robert LL, Perich MJ, Schlein Y, Jacobson RL, Wirtz RA, Lawyer PG., y col. **Phlebotomine sand fly control using bait-fed adults to carry the larvicide Bacillus sphaericus to the larval habitat.** J Am Mosq Control Assoc. 1997 Jun;13(2):140-144.

Roberts SC, Tancer MJ, Polinsky MR, Gibson KM, Heby O, Ullman B. **Arginase plays a pivotal role in polyamine precursor metabolism in Leishmania. Characterization of gene deletion mutants.** J Biol Chem. 2004 May 28;279(22):23668-23678.

Rochette A, Raymond F, Corbeil J, Ouellette M, Papadopoulou B. **Whole-genome comparative RNA expression profiling of axenic and intracellular amastigote forms of Leishmania infantum.** Mol Biochem Parasitol. 2009 May;165(1):32-47.

Rosenzweig D, Smith D, Opperdoes F, Stern S, Olafson RW, Zilberstein D. **Retooling Leishmania metabolism: from sand fly gut to human macrophage.** FASEB J. 2008 Feb;22(2):590-602.

Saadalla V, Rassam MB. **Regulation of aerobic fermentation in Leishmania donovani promastigotes by NADP⁺-dependent malic enzyme.** Ann Trop Med Parasitol. 1987 Dec;81(6):687-692.

Saar Y, Ransford A, Waldman E, Mazareb S, Amin-Spector S, Plumblee J., y col. **Characterization of developmentally-regulated activities in axenic amastigotes of Leishmania donovani.** Mol Biochem Parasitol. 1998 Sep 1;95(1):9-20.

Sacks D, Noben-Trauth N. **The immunology of susceptibility and resistance to Leishmania major in mice.** Nat Rev Immunol. 2002 Nov;2(11):845-858.

Sacks DL, Hieny S, Sher A. **Identification of cell surface carbohydrate and antigenic changes between noninfective and infective developmental stages of Leishmania major promastigotes.** J Immunol. 1985 Jul;135(1):564-569.

Sacks DL, Modi G, Rowton E, Spath G, Epstein L, Turco SJ., y col. **The role of phosphoglycans in Leishmania-sand fly interactions.** Proc Natl Acad Sci U S A. 2000 Jan 4;97(1):406-411.

Sacks DL, Perkins PV. **Identification of an infective stage of Leishmania promastigotes.** Science. 1984 Mar 30;223(4643):1417-1419.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. **Purification of Nucleic Acids.** . 1989;Molecular Cloning 3(3).

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. **DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.** Proc Natl Acad Sci U S A. 1977 Dec;74(12):5463-5467.

Saxena A, Lahav T, Holland N, Aggarwal G, Anupama A, Huang Y., y col. **Analysis of the Leishmania donovani transcriptome reveals an ordered progression of transient and permanent changes in gene expression during differentiation.** Mol Biochem Parasitol. 2007 Mar;152(1):53-65.

Schadewaldt P, Adelmeyer F. **Coupled enzymatic assay for estimation of branched-chain L-amino acid aminotransferase activity with 2-Oxo acid substrates.** Anal Biochem. 1996 Jun 15;238(1):65-71.

Scharton-Kersten T, Afonso LC, Wysocka M, Trinchieri G, Scott P. **IL-12 is required for natural killer cell activation and subsequent T helper 1 cell development in experimental leishmaniasis.** J Immunol. 1995 May 15;154(10):5320-5330.

Seed JR, Hall JE, Price CC. **A physiological mechanism to explain pathogenesis in African trypanosomiasis.** Contrib Microbiol Immunol. 1983;7:83-94.

Sharifi I, FeKri AR, Aflatonian MR, Khamesipour A, Nadim A, Mousavi MR., y col. **Randomised vaccine trial of single dose of killed Leishmania major plus BCG against anthroponotic cutaneous leishmaniasis in Bam, Iran.** Lancet. 1998 May 23;351(9115):1540-1543.

Sivaraman S, Kirsch JF. **The narrow substrate specificity of human tyrosine aminotransferase--the enzyme deficient in tyrosinemia type II.** FEBS J. 2006 May;273(9):1920-1929.

Sobrado VR, Montemartini-Kalisz M, Kalisz HM, De La Fuente MC, Hecht HJ, Nowicki C. **Involvement of conserved asparagine and arginine residues from the N-terminal region in the catalytic mechanism of rat liver and Trypanosoma cruzi tyrosine aminotransferases.** Protein Sci. 2003 May;12(5):1039-1050.

Spath GF, Beverley SM. **A lipophosphoglycan-independent method for isolation of infective Leishmania metacyclic promastigotes by density gradient centrifugation.** Exp Parasitol. 2001 Oct;99(2):97-103.

Steiger RF, Steiger E. **Cultivation of Leishmania donovani and Leishmania braziliensis in defined media: nutritional requirements.** J Protozool. 1977 Aug;24(3):437-441.

Stibbs HH, Seed JR. **Elevated serum and hepatic tyrosine aminotransferase in voles chronically infected with Trypanosoma brucei gambiense.** Exp Parasitol. 1976 Feb;39(1):1-6.

Stierhof YD, Bates PA, Jacobson RL, Rogers ME, Schlein Y, Handman E., y col. **Filamentous proteophosphoglycan secreted by Leishmania promastigotes forms gel-like three-dimensional networks that obstruct the digestive tract of infected sandfly vectors.** Eur J Cell Biol. 1999 Oct;78(10):675-689.

Sufrin JR, Meshnick SR, Spiess AJ, Garofalo-Hannan J, Pan XQ, Bacchi CJ. **Methionine recycling pathways and antimalarial drug design.** Antimicrob Agents Chemother. 1995 Nov;39(11):2511-2515.

Sundar S, Rai M. **Advances in the treatment of leishmaniasis.** Curr Opin Infect Dis. 2002 Dec;15(6):593-598.

- Sundstrom C, Nilsson K. **Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937)**. Int J Cancer. 1976 May 15;17(5):565-577.
- Tao X, Yang Z, Tong L. **Crystal structures of substrate complexes of malic enzyme and insights into the catalytic mechanism**. Structure. 2003 Sep;11(9):1141-1150.
- Tetreault GE, Zayed AE, Hanafi HA, Beavers GM, Zeichner BC. **Susceptibility of sand flies to selected insecticides in North Africa and the Middle East**. J Am Mosq Control Assoc. 2001 Mar;17(1):23-27.
- Tizard I, Nielsen KH, Seed JR, Hall JE. **Biologically active products from African Trypanosomes**. Microbiol Rev. 1978 Dec;42(4):664-681.
- Toro MA, Sanchez-Murcia PA, Moreno D, Ruiz-Santaquiteria M, Alzate JF, Negri A., y col. **Probing the dimerization interface of Leishmania infantum trypanothione reductase with site-directed mutagenesis and short peptides**. Chembiochem. 2013 Jul 8;14(10):1212-1217.
- Turco SJ, Sacks DL. **Expression of a stage-specific lipophosphoglycan in Leishmania major amastigotes**. Mol Biochem Parasitol. 1991 Mar;45(1):91-99.
- Turco SJ, Spath GF, Beverley SM. **Is lipophosphoglycan a virulence factor? A surprising diversity between Leishmania species**. Trends Parasitol. 2001 May;17(5):223-226.
- Veitch NJ, Maugeri DA, Cazzulo JJ, Lindqvist Y, Barrett MP. **Transketolase from Leishmania mexicana has a dual subcellular localization**. Biochem J. 2004 Sep 1;382(Pt 2):759-767.
- Verlinde CL, Hannaert V, Blonski C, Willson M, Perie JJ, Fothergill-Gilmore LA., y col. **Glycolysis as a target for the design of new anti-trypanosome drugs**. Drug Resist Updat. 2001 Feb;4(1):50-65.
- Vernal J, Jose Cazzulo J, Nowicki C. **Cloning and heterologous expression of a broad specificity aminotransferase of Leishmania mexicana promastigotes1**. FEMS Microbiol Lett. 2003 Dec 12;229(2):217-222.
- Vieira LL, Cabantchik ZI. **Amino acid uptake and intracellular accumulation in Leishmania major promastigotes are largely determined by an H(+)-pump generated membrane potential**. Mol Biochem Parasitol. 1995 Dec;75(1):15-23.
- Walker DM, Oghumu S, Gupta G, McGwire BS, Drew ME, Satoskar AR. **Mechanisms of cellular invasion by intracellular parasites**. Cell Mol Life Sci. 2014 Apr;71(7):1245-1263.
- Walker J, Vasquez JJ, Gomez MA, Drummelsmith J, Burchmore R, Girard I., y col. **Identification of developmentally-regulated proteins in Leishmania panamensis by proteome profiling of promastigotes and axenic amastigotes**. Mol Biochem Parasitol. 2006 May;147(1):64-73.
- Waller RF, McConville MJ. **Developmental changes in lysosome morphology and function Leishmania parasites**. Int J Parasitol. 2002 Nov;32(12):1435-1445.
- Waugh B, Ghosh A, Bhattacharyya D, Ghoshal N, Banerjee R. **In silico work flow for scaffold hopping in Leishmania**. BMC Res Notes. 2014;7:802.

Westrop GD, Williams RA, Wang L, Zhang T, Watson DG, Silva AM., y col. **Metabolomic Analyses of Leishmania Reveal Multiple Species Differences and Large Differences in Amino Acid Metabolism.** PLoS One. 2015;10(9):e0136891.

Whittaker RH, Margulis L. **Protist classification and the kingdoms of organisms.** Biosystems. 1978 Apr;10(1-2):3-18.

Winter G, Fuchs M, McConville MJ, Stierhof YD, Overath P. **Surface antigens of Leishmania mexicana amastigotes: characterization of glycoinositol phospholipids and a macrophage-derived glycosphingolipid.** J Cell Sci. 1994 Sep;107 (Pt 9):2471-2482.

Wlodawer A, Minor W, Dauter Z, Jaskolski M. **Protein crystallography for non-crystallographers, or how to get the best (but not more) from published macromolecular structures.** FEBS J. 2008 Jan;275(1):1-21.

Wu G, Robertson DH, Brooks CL, 3rd, Vieth M. **Detailed analysis of grid-based molecular docking: A case study of CDOCKER-A CHARMM-based MD docking algorithm.** J Comput Chem. 2003 Oct;24(13):1549-1562.

Yao C, Chen Y, Sudan B, Donelson JE, Wilson ME. **Leishmania chagasi: homogenous metacyclic promastigotes isolated by buoyant density are highly virulent in a mouse model.** Exp Parasitol. 2008 Jan;118(1):129-133.

Yoshikane Y, Yokochi N, Ohnishi K, Hayashi H, Yagi T. **Molecular cloning, expression and characterization of pyridoxamine-pyruvate aminotransferase.** Biochem J. 2006 Jun 15;396(3):499-507.

Yoshikane Y, Yokochi N, Yamasaki M, Mizutani K, Ohnishi K, Mikami B., y col. **Crystal structure of pyridoxamine-pyruvate aminotransferase from Mesorhizobium loti MAFF303099.** J Biol Chem. 2008 Jan 11;283(2):1120-1127.

Zarella-Boitz JM, Rager N, Jardim A, Ullman B. **Subcellular localization of adenine and xanthine phosphoribosyltransferases in Leishmania donovani.** Mol Biochem Parasitol. 2004 Mar;134(1):43-51.

Zhang K, Hsu FF, Scott DA, Docampo R, Turk J, Beverley SM. **Leishmania salvage and remodelling of host sphingolipids in amastigote survival and acidocalcisome biogenesis.** Mol Microbiol. 2005 Mar;55(5):1566-1578.

Zhang WW, McCall LI, Matlashewski G. **Role of cytosolic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in visceral organ infection by Leishmania donovani.** Eukaryot Cell. 2013 Jan;12(1):70-77.

Zhang Y, Edwards TE, Begley DW, Abramov A, Thompkins KB, Ferrell M., y col. **Structure of nitrilotriacetate monooxygenase component B from Mycobacterium thermoresistibile.** Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun. 2011 Sep 1;67(Pt 9):1100-1105.

Zilberstein D, Shapira M. **The role of pH and temperature in the development of Leishmania parasites.** Annu Rev Microbiol. 1994;48:449-470.